

P19-2015-89

Н. А. Колтовая \*

**ЦИКЛИН-ЗАВИСИМАЯ КИНАЗА CDK1/CDC28  
И КОНТРОЛЬНЫЕ ТОЧКИ ПРОХОЖДЕНИЯ  
КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА (ЧЕКПОЙНТЫ)**

Направлено в журнал «Биохимия»

---

\* E-mail: [koltovaya@jinr.ru](mailto:koltovaya@jinr.ru)

Циклин-зависимая киназа CDK1/CDC28 и контрольные точки прохождения клеточного цикла (чекпойнты)

Нарушения цикла деления клеток вызывают генетическую нестабильность, являющуюся причиной заболеваний человека, в том числе неопластической трансформации клеток. Механизм контроля правильности прохождения клеточного цикла наиболее хорошо изучен у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которых впервые был обнаружен чекпойнт-контроль. В настоящее время идентифицировано большое количество компонентов этого процесса. В данном обзоре рассматривается участие центральной киназы CDK1/CDC28, регулирующей деление клетки, в чекпойнт-контроле в разных фазах клеточного цикла.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Cyclin-Dependent Kinase CDK1/CDC28 and Checkpoints

The genetic instability induced by defects in the cell cycle progression contributes to different human diseases, particularly neoplastic transformation. The control mechanisms of correct cell cycle progression are the most studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which checkpoint was first discovered. Many components of these processes have been identified by now. Here, the role of the central kinase of cell cycle CDK1/CDC28 is considered in checkpoint in different phases.

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

На всех стадиях клеточного цикла существуют контрольные точки, в которых проверяется правильность прохождения клеточного цикла и, в частности, целостность генома. При нарушении процесса деления или повреждении ДНК в этих точках активируется специальный механизм, названный *чекпойнтом*, который осуществляет остановку деления клетки и устранение нарушений. Так, чекпойнт повреждений ДНК помимо остановки клеточного деления обеспечивает репарацию ДНК [1], контролирует длину теломера [2], активирует транскрипцию [3] и запускает апоптоз [4]. Сигнал-передающий каскад фосфорилирования чекпойнтов состоит из нескольких этапов (рисунок).

Вначале формируется сигнал, и повреждения узнаются белками-сенсорами. Затем с помощью адапторов к повреждениям доставляются сенсорные киназы, которые фосфорилируют медиаторы, в свою очередь привлекающие эффекторные киназы [5]. Эффекторные киназы активируются в результате фосфорилирования сенсорными киназами. И, наконец, активированные эффекторные киназы фосфорилируют специфические мишенные белки (эффекторы), осуществляющие остановку клеточного деления. Генерируемый сигнал чекпойнта ограничивается ядром и не выходит за его пределы в цитоплазму [6]. Показано, что единичный двунилевой разрыв (ДНР), индуцированный НО-эндонуклеазой в одном из ядер двуядерного гетерокариона, вызывал остановку деления ядра в анафазе. При этом у второго неповрежденного ядра наблюдали нормальное деление, и происходил выход из митоза.

Циклин-зависимая киназа CDK1/CDC28 является привлекательной мишенью для чекпойнтов, поскольку участвует в регуляции прохождения клеточного цикла [7]. Однако в отличие от большинства эукариотических организмов у почкующихся дрожжей полная инактивация киназы невозможна, так как это единственная центральная киназа, регулирующая многочисленные процессы клеточного деления. Молекулярные механизмы регуляции остановки клеточного цикла киназой CDK1 при повреждении компонентов клетки в настоящее время изучены недостаточно. В данной статье рассмотрены некоторые аспекты участия киназы CDK1 в чекпойнтах, особое внимание обращается на различия механизмов чекпойнта в разных фазах клеточного цикла.



### **Схема чекпойнтов, индуцируемых репликативным стрессом и повреждениями ДНК**

CDK1 регулирует активность многочисленных белков чекпойнта повреждений ДНК (субстраты CDK1 выделены рамкой). Сенсоры чувствуют повреждения ДНК или репликативный стресс и активируют PIKKs киназы Mec1 и Tel1. Активация эффекторных киназ (Rad53, Dun1 и Chk1) опосредуется двумя медиаторами — Rad9 и Mtc1. Если Mtc1 функционирует в качестве медиатора в процессе репликации ДНК, то Rad9 может узнавать повреждения, которые возникают вне S-фазы. Медиатор Rad9 (или Mtc1) фосфорилируется киназой Mec1 в ответ на повреждения ДНК. Это обеспечивает его ассоциацию с киназой Rad53, приводящую к активации Rad53 киназой Mec1 и последующему автофосфорилированию Rad53. Эффекторные протеинкиназы фосфорилируют и активируют многочисленные мишени (только часть этих белков указана на рисунке), осуществляющие остановку клеточного цикла и исправление нарушения. В случае регуляции транскрипции эффекторами служат транскрипционные факторы, узнающие *cis*-элементы в промоторной области индуцибельных генов. Некоторые из этих эффекторов также фосфорилируются киназой CDK1, хотя последствия одновременного фосфорилирования двумя киназами не всегда понятны. Например, CDK1 может фосфорилировать Rad9, усиливая сигнальный каскад, или Rad53, фосфорилирование которой имеет значение не в активации, а в предотвращении адаптации.

## ОБЩАЯ СХЕМА ЧЕКПОЙНТА

У *Saccharomyces cerevisiae* наиболее хорошо изучены чекпойнты целостности ДНК, или чекпойнты, индуцируемые повреждениями ДНК. Сигналом для активации чекпойнта служит однонитевая ДНК (онДНК) [8, 9]. Первичные повреждения ДНК, процессинг которых приводит к образованию участка онДНК, также активируют чекпойнт (см. рисунок). Так, активация чекпойнта повреждениями, индуцированными УФ-светом, обусловлена процессингом повреждений во время эксцизионной репарации NER (*nucleotide excision repair*). Белок эксцизионной репарации Rad14, который узнает и связывается с повреждением ДНК, физически взаимодействует с сенсором чекпойнта Ddc1 [10]. Протомер Rad14 входит в состав фактора NEF1 (Rad14-Rad1-Rad10) и опосредует доставку к повреждению эндонуклеазы Rad1-Rad10, образующей ник с 5'-конца от повреждения. Активация чекпойнта ДНР ДНК происходит в результате процессинга ДНР экзонуклеазным комплексом MRX (Mre11-Rad50-Xrs2)-Sae2, расщепляющим 5'-нить с образованием короткого (~ 100 нуклеотидов) 3'-конца онДНК [11, 12]. Индукция чекпойнта происходит также при накоплении онДНК в теломерах у мутанта *cdc13-1* и накоплении ДНР при инактивации ДНК-лигазы Cdc9.

**G1/S- и G2/M-чекпойнты.** Сенсоры, узнающие повреждения, вызванные УФ-светом, ионизирующей радиацией (ИР) и ДНР эндогенного происхождения, индуцируют G1/S- и G2/M-чекпойнты. Участки онДНК узнаются несколькими белковыми комплексами (см. рисунок), такими как RPA (*replication protein A*), Rad24-RFC и Ddc1-Mec3-Rad17 [13]. Прежде всего, участки онДНК покрываются гетеротримером RPA (Rpa1-Rpa2-Rpa3). К границе между RPA-онДНК и дуплексом ДНК доставляется гетеротример Ddc1-Mec3-Rad17 [14] (у человека ортологи hRad9, hHus1, hRad1), проявляющий сходство со скрепкой или репликативным фактором процессивности гомотримером PCNA (Pol30). В процессе репликации загрузка скрепки PCNA на границу 3'-онДНК/днДНК осуществляется гетеропентамерным комплексом RFC (*replication factor C*). В сайте повреждения ДНК комплекс Ddc1-Mec3-Rad17 загружается на границу 5'-онДНК/днДНК модифицированной формой RFC, в которой субъединица Rfc1 заменена чекпойнт-специфичной субъединицей Rad24 (Rad24-RFC).

В передаче сигнала большое значение имеют протеинкиназы. Сенсорные и эффекторные киназы консервативны у эукариот и хорошо охарактеризованы. К сенсорным киназам, связывающимся с повреждениями ДНК, относятся киназы Mec1 и Tel1, ортологи PIKK (*phosphoinositide 3 kinase-related kinases*) киназ у млекопитающих — ATR и ATM соответственно. Киназы Mec1 и Tel1 привлекаются к повреждению ДНК с помощью Ddc2 и MRX соответственно. У дрожжей Mec1 является основной сигнальной молекулой чекпойнтов. К эффекторным киназам относятся Rad53 (у человека hChk2), Dun1 и Chk1 (hChk1).

Сигнальная киназа Mec1 ассоциирует с поврежденным хроматином посредством белка Ddc2, который взаимодействует как с ДНК, так и с RPA-онДНК [15, 16]. Связывание Mec1-Ddc2 с RPA приводит к активации киназы, при этом две субъединицы Mec1 фосфорилируют друг друга, и комплекс разрушается, высвобождая активную форму киназы Mec1, которая взаимодействует с субстратами [17, 18]. Отметим, что комплекс Rad24-RFC необходим только для загрузки Ddc1-Mec3-Rad17 и не нужен для активации чекпойнта, если комплекс с Mec1-Ddc2 уже образовался. Сайт повреждения ДНК, по-видимому, служит платформой для концентрации адапторных молекул. Протеин Ddc1 комплекса Ddc1-Mec3-Rad17 увеличивает киназную активность Mec1, как напрямую, так и рекрутируя второй активатор Mec1 — белок Dpb11 [19–21].

Однако для последующей активации эффекторной киназы Rad53 недостаточно колокализации комплексов Mec1-Ddc2 и Ddc1-Mec3-Rad17, дополнительно необходим медиатор Rad9. Доставку Rad9 осуществляет комплекс (Ddc1-Mec3-Rad17)-Dpb11 [22, 23]. Кроме того, для эффективной доставки Rad9 и ортолога у человека 53BP1 необходимы, по крайней мере, две модификации гистонов — фосфорилирование H2A и метилирование H3(H4) [24, 25]. В ответ на повреждение ДНК активные киназы Mec1 или Tel1 быстро фосфорилируют две субъединицы RPA (Rpa1 и Rpa2) и С-концы гистонов H2A вокруг ДНР [26, 27]. Гистон H2A фосфорилируется по серину 129 (H2AS129ph) на расстоянии 50 т. п. н. по обе стороны от повреждения [28]. Эта модификация обеспечивает взаимодействие с Rad9. Аналогично у позвоночных 53BP1 ассоциирует с вариантом гистона H2A (H2AXS139ph) после фосфорилирования гистона киназами АТМ или АТР [29, 30]. Кроме того, конститутивное метилирование лизина 79 гистона H3 (H3K79me) метилтрансферазой Dot1 опосредует взаимодействие с Tudor-доменом Rad9 [24, 31]. Так как в ответ на повреждение ДНК метилирование гистона H3 не изменяется, предполагается, что связывание белков чекпойнта с модифицированным гистоном становится возможным в результате изменения структуры хроматина, происходящего в ответ на возникновение ДНР [24]. Аналогично метилирование лизина 20 гистона H4 (H4K20me) необходимо для поддержания 53BP1 [32]. При наличии двух меток белок Rad9 связывается с хроматином [33] и активно привлекает вспомогательные белки к ДНР. Таким образом, адапторные белки у дрожжей и позвоночных для посадки на хроматин вблизи сайта повреждения используют схожие механизмы — фосфорилирование и метилирование коровых гистонов. Элиминация обеих модификаций (фосфорилирование H2AS129ph и метилирование H3K79me) снижает фосфорилирование после облучения клеток ИР [25]. По-видимому, ДНК выступает не только в качестве платформы для сборки адапторных молекул вблизи сенсорных киназ, но также участвует в формировании структуры хроматина вблизи повреждения, которая обеспечивает усиление сигнала, удерживая компоненты чекпойнта.

В дальнейшем фосфорилирование медиатора Rad9 сенсорной киназой Mec1 обеспечивает активацию и олигомеризацию Rad9. Индуцированное повреждениями ДНК фосфорилирование Rad9 коррелирует с ремоделированием Rad9-комплекса (~ 850 кДа) в меньший по размеру комплекс (560 кДа), содержащий индуцированную повреждениями ДНК гиперфосфорилированную форму Rad9 [34, 35]. Эта форма позволяет Rad9 осуществлять функцию адаптора катализа для активации киназы Rad53 [36]. Rad53 связывается с фосфорилированным Rad9 через домены FHA (*forkhead homology associated*), ответственные за взаимодействие между фосфорилированными белками [37, 38]. Это связывание подготавливает Rad53 к фосфорилированию киназой Mec1 [39]. Для полной активации Rad53 необходимо дополнительное автофосфорилирование [35, 40], которое катализируется повышением локальной концентрации Rad53 на Rad9-платформе [36].

Всего выделено 13 сайтов автофосфорилирования Rad53 и 14 сайтов фосфорилирования другими киназами, в том числе Mec1 и CDK1 (см. ниже). Множественность сайтов фосфорилирования обеспечивает механизм переключения, использующий критический уровень фосфорилирования для полной активации. Четыре акцепторных сайта располагаются в SQ/TQ-кластерах вблизи каждого из двух доменов FHA. С-концевой FHA2-домен обеспечивает взаимодействие с фосфорилированным медиатором Rad9 и является критическим для приема сигнала чекпойнта, активированного повреждениями ДНК. N-концевой FHA1-домен взаимодействует не только с Rad9, но и с компонентом репликативного чекпойнта геликазой Sgs1. Всего выделено 26 белков, взаимодействующих с FHA1 и ответственных за широкий спектр функций Rad53 [41], в том числе с фосфатазами Ptc2 и Ptc3, участвующими в ингибировании функционирования Rad53 [42].

Активированный Rad53 покидает сайт повреждения и фосфорилирует эффекторы чекпойнта, что ведет к остановке клеточного цикла и регуляции транскрипции (см. рисунок). К идентифицированным мишеням Rad53 относятся транскрипционный регулятор Swi6 и киназы Dun1 и Dbf4. Фосфорилирование этих мишеней ведет к подавлению G1-циклинов, разрушению ингибитора рибонуклеотидредуктазы Sml1 и ингибированию открытия поздних сайтов репликации *ori* соответственно. Rad53 участвует в стабилизации репликативной вилки, регуляции транскрипции и уровня накопления гистонов [43].

Большая часть Rad53-зависимого ответа у дрожжей определяется киназой Mec1 [44, 45]. Сенсорная киназа Tel1 похожа на Mec1 и может осуществлять некоторые из ее функций. Tel1 фосфорилирует и активирует Rad53, используя медиатор Rad9, однако для этого не требуются белки Ddc1 и Dpb11 [46, 47]. Tel1 вносит слабый вклад в активацию Rad53, и это происходит в специфических условиях повреждения ДНК [48–50]. Чекпойнт поврежденных ДНК имеет, по крайней мере, два пути, контролируемые эффек-



торными киназами Rad53 и Chk1. Фосфорилирование Chk1 также зависит от Rad9 [51–53].

**Intra S-чекпойнт.** Иная ситуация складывается при репликации ДНК. В процессе синтеза ДНК репликативная вилка подвергается различным видам стресса. Многие внешние факторы вызывают репликативный стресс, включая повреждение матрицы ДНК, снижение пула дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в результате ингибирования гидроксимочевинной (ГМ) биосинтеза дНТФ или остановки машины репликации ДНК-связывающими белками. В S-фазе сигналом, активирующим чекпойнт, служит застрявшая репликативная вилка [54]. Сенсорами выступают полимераза Pol $\epsilon$  и взаимодействующие с ней белки Dpb11 и Drc1, а также геликаза Sgs1, которая обладает АТФазной активностью и связывается с разветвленными структурами ДНК. Предполагается, что она участвует в формировании сигнала посредством разрешения aberrантных спаренных двойных спиралей [55]. Она принадлежит к той же эпистатической группе в отношении активации Rad53 в присутствии ГМ, что и Pol $\epsilon$ , и этот сигнальный путь действует параллельно Rad17 и Rad24 [56]. Однако не ясно, действительно ли S-специфичные сенсоры Pol $\epsilon$  и Sgs1 узнают повреждения ДНК или их функционирование приводит к образованию общих интермедиатов, в том числе таких как онДНК. В ответ на повреждение ДНК комплекс Rad6-Rad18 моноубиквитинирует скрепку PCNA (Pol30K164ub), облегчая связывание с полимеразам TLS (*translesion synthesis*) для прохождения повреждения, блокирующего репликацию [57]. Дальнейшее полиубиквитинирование того же сайта PCNA комплексом Rad5-Ubc13-Mms2 активирует безошибочный путь переключения репликации на неповрежденную нить хроматина.

Чекпойнт репликации ДНК в основном использует те же самые белки, что и чекпойнт поврежденной ДНК. Главное различие заключается в использовании разных медиаторов. В репликативном чекпойнте вместо Rad9 в качестве медиатора выступает гетеротримерный комплекс Mrc1-Tof1-Csm3 (ортологи у позвоночных Claspin, Timeless, Tipin соответственно). С реплисомой непосредственно связаны два протомера Tof1 и Csm3, которые опосредуют связывание Mrc1 с репликативной вилкой [58]. Эти белки взаимодействуют с репликативными комплексами и белками GINS, MCM, Cdc45, Pol $\epsilon$  [59]. Белок Mrc1 облегчает процесс элонгации репликации в невозмущенных условиях, а также выступает в роли медиатора репликативного чекпойнта и необходим для передачи сигнала о повреждении ДНК от Mec1 к Rad53 в процессе репликативного стресса. Поскольку медиатор Mrc1 является частью реплисомы и движется с ней в процессе репликации [60, 61], то он не нуждается в специальной доставке к застрявшей репликативной вилке. С другой стороны, в определенных хромосомных сайтах, в которых негистоновые белки тесно связаны с ДНК, для соответствующего ареста необходимы Tof1 и Csm3, а не Mrc1 [62].

Медиатор Mrc1 осуществляет мониторинг продвижения репликативной вилки и ее остановку в ответ на репликативный стресс. С другой стороны, медиатор выступает в качестве молекулярного якоря при последующей загрузке сенсорных и эффекторных киназ. Сценарий приблизительно следующий: репликативная машина Pol $\epsilon$ /Mrc1 узнает повреждение; к застрявшей вилке рекрутируется киназа Mec1, вероятно, посредством взаимодействия с участками онДНК, покрытыми комплексами RPA [61, 63]. Оба канонических активатора киназы Mec1 — Ddc1 и Dpb11 — могут участвовать в репликативном чекпойнте [64], хотя не ясно, действительно ли они абсолютно необходимы [21, 65]. В застрявшей репликативной вилке киназа Mec1 фосфорилирует медиатор Mrc1 [61], который содержит 17 SQ/TQ-сайтов фосфорилирования киназой Mec1. По-видимому, изменения конформации Mrc1 влияют на взаимодействие с компонентами реплисома. Показано, что фосфорилирование Mrc1 приводит к высвобождению N-конца большой субъединицы Pol $\epsilon$  (Pol2), но взаимодействие между Mrc1ph и C-концом Pol2 сохраняется [66]. Белки Mrc1 и Mec1 необходимы для стабилизации полимераз Pol $\epsilon$  и Pol $\alpha$  [67–69]. Белок Mrc1 ингибирует отсоединение репликативной геликазы Mcm2-7 от полимеразы на лидирующей нити и запирает обе половины реплисома в застрявшей вилке [59]. Таким образом, фосфорилированный медиатор Mrc1 стабилизирует застрявшую реплисома, которая остается связанной с репликативной вилкой, и удерживает киназу Mec1 в области застрявшей вилки.

Такое взаимодействие создает платформу для последующих событий чекпойнта, включая доставку и фосфорилирование Rad53. Совместная локализация Mec1 и Mrc1 достаточна для рекрутирования, фосфорилирования и активации Rad53 [70]. Mrc1 фосфорилируется не только киназой Mec1, но и Rad53 [60]. Активация Rad53 и дополнительное фосфорилирование медиатора Mrc1 позволяют поддерживать реплисома и репликативную вилку до тех пор, пока репликация не возобновится. Существует несколько механизмов стабилизации вилки. Mec1 и Rad53 могут функционировать на разных путях стабилизации застрявшей вилки. Rad53 стабилизирует застрявшую репликативную вилку, частично блокируя активность Eho1 [71]. Кроме того, Rad53 имеет Eho1-независимую функцию [72]. Киназа Rad53, по-видимому, является основным участником стабилизации вилки. Однако в отсутствие Rad53 в стабилизации вилки принимает участие киназа Chk1 [71].

В S-фазе клеточного цикла существует дополнительная роль фосфорилированных гистонов H2AS129ph в сборке когезиновых комплексов в сайте ДНР. В норме когезиновый комплекс скрепляет сестринские хроматиды в местах, разделенных расстоянием около 10–15 т. п. н. Однако когда в одной из хроматид появляется ДНР, с обеих сторон ДНР собирается множество когезиновых комплексов, связывающих разорванную и нативную хроматиды. При этом роль фосфорилированного гистона H2AS129ph состоит в том, чтобы

связать в сайте ДНР специализированные белки (Csm3, Tof1, Mrc1, Rad9, Ddc1), участвующие в организации когезии хроматид [73]. Возникновение когезинового домена вокруг ДНР облегчает поиск гомологии при репарации ДНР путем гомологичной рекомбинации HR (*homologous recombination*), а сигналом для перестройки когезинового комплекса служит фосфорилирование гистона H2AS129ph [74].

## АКТИВАЦИЯ ЧЕКПОЙНТА

Дрожжевая клетка, столкнувшаяся с повреждением в G1, замедляет на 20–30 мин вступление в фазу S. У дрожжей остановка в G1/S, по-видимому, обеспечивает время для репарации [75], а у млекопитающих — для запуска апоптоза. Эта задержка значительно короче, чем опосредованная чекпойнтом остановка в G2/M продолжительностью до 8 ч. Так, при индукции НО-эндонуклеазой единичного ДНР происходит Mec1-зависимая короткая задержка в G1 (15 мин) и длительная задержка (8–12 ч) в G2 перед анафазой, но не наблюдается задержки в фазе S или активации S-зависимого чекпойнта [76]. Возможно, эта разница связана с тем, что в G2/M доступен более широкий спектр типов репарации, в том числе межхроматидный обмен HR. В G1 ДНР репарируется по механизму объединения концов NHEJ (*nongomologous end joining*), не требующему протяженных участков онДНК, а следовательно, и интенсивной резекции.

В фазе G1 машина репарации различает разные типы разрывов, которые транслируются в различные моды репарации и чекпойнт-активации в G1 и S/G2 клетках. Разрывы в участках ДНК, связанных с нуклеосомой, образуют короткие фрагменты онДНК. В то же время разрывы в линкерных участках образуют более протяженные фрагменты онДНК. В случае тупых, немодифицированных или липких концов, а также простого разрыва с образованием коротких 3'- и 5'-однонитевых концов репарация ДНР осуществляется путем NHEJ [77]. С концами связывается комплекс Ku70/Ku80, и происходит прямое воссоединение концов. Для NHEJ не требуется индукция экспрессии белков, так как Ku-белки депонированы в теломерных участках хромосом и перераспределяются при появлении разрывов. Если концы ДНР ДНК не обладают свойствами, подходящими для быстрого воссоединения, в процесс репарации вовлекаются нуклеазы Sae2 и Pso2 (у человека гомолог *Artemis*). Помимо Ku с концами ДНР может связываться нуклеазный комплекс MRX-Sae2, осуществляющий небольшой процессинг (1–2 н.). Ku-гетеродимер ингибирует процессинг ДНК экзонуклеазами и замедляет скорость процессинга комплексом MRX. За онДНК с комплексом MRX конкурируют белки RPA, которые связываются с онДНК длинных, процессирующихся концов, и активируют чекпойнт. Если резекция концов ДНР

достигает длины более четырех нуклеотидов, для репарации необходимы ветви HR.

В G1 большая часть ДНР, индуцированных ИР, эффективно процессируется, подготавливаясь к HR, и связывается с Rfa1. В то же время разрывы, индуцируемые HO-эндонуклеазой, узнаются Rfa1 только после вступления в фазу S, и это зависит от комплекса Ku, связанного с концами ДНР. Однако последующие стадии HR, связанные с Rad52, ингибированы в G1. Далее в процессе клеточного цикла происходит активация HR в результате фосфорилирования Rad52 киназой CDK1. Рекрутирование Rad52 осуществляется только после вступления в фазу S [78]. Rad52 конститутивно фосфорилируется по нескольким сайтам сериновых и треониновых остатков. При вступлении в фазу S происходит дополнительное фосфорилирование. Фосфорилируется С-конец, хотя конкретные остатки и фенотипический эффект отсутствия фосфорилирования еще предстоит выяснить. После повреждения ДНК дополнительного фосфорилирования не происходит. Причем фосфорилирование не зависит от Mec1 и Tel1, что подчеркивает его независимость от повреждений ДНК. Активность CDK1 необходима для рекрутирования Rad52 в фокусы [79], однако не ясно, действительно ли CDK1 напрямую ответственна за циклозависимое фосфорилирование [80]. Хотя делеции активаторов CDK1 циклинов S-фазы CLB5 и CLB6 (B-тип) замедляют рекрутирование рекомбинационного белка, но не исключено, что CDK1 фосфорилирует вышестоящий фактор, например, RPA. Так же как и Rad52, Rfa2 фосфорилируется способом, зависимым от прохождения клеточного цикла и в ответ на генотоксичный стресс [79, 81, 82]. Таким образом, протяженная ресекция и рекрутирование Rad52 инициируются при прохождении G1/S и регулируются киназой CDK1. Возможная роль модифицированного Rad52 в ответ на повреждение заключается в релокализации Rad52 из диффузного ядерного распределения в отдельные фокусы в сайтах ДНР. Возможно, что начальный уровень фосфорилирования, обнаруживаемый при прохождении клеточного цикла, негативно регулирует фокусы Rad52, а клеточно-зависимое фосфорилирование обеспечивает образование фокусов для HR.

Механизмы активации чекпойнтов в G1 и G2 также отличаются. Активация чекпойнта ДНР в фазе G1 не нуждается в CDK1 [83], имеющей в этой фазе низкую активность. Однако в фазах G2/M эффективное формирование сигнала чекпойнта нуждается в активности CDK1, и частично это связано с участием CDK1 в процессинге ДНР [83–86]. CDK1 фосфорилирует S267 нуклеазы Sae2, формирующей участок онДНК [87] и необходимой для активации чекпойнта [83]. Второй мишенью киназы CDK1 является нуклеаза Dna2, фосфорилирование которой обеспечивает ее доставку в ядро [88]. Нуклеаза Sae2 образует короткие участки онДНК, для формирования более протяженных фрагментов требуется участие нуклеаз Dna2 и Eho1, комплекса MRX и геликазы Sgs1.

Хотя резекция играет важную роль в усилении сигнала, было показано, что CDK1 необходима также для последующих шагов рекрутирования сенсоров и адапторов. Для эффективной передачи сигнала чекпойнта необходимы PCNA-подобная скрепка Ddc1-Mec3-Rad17 и киназа Mec1-Ddc2. Было показано, что в асинхронных культурах они связываются с RPA независимо друг от друга [89–92], и для активации чекпойнта они необходимы и достаточны [93]. Однако в G1 для рекрутирования Mec1-Ddc2 к ДНР необходимо предварительное связывание скрепки Ddc1-Mec3-Rad17 с RPA [94]. В S/G2 для рекрутирования Mec1-Ddc2 дополнительно к RPA и Ddc1-Mec3-Rad17 требуется активная киназа CDK1, которая сама по себе недостаточна для активации чекпойнта. В фазе S, когда активность CDK1 достаточно высока, необходимо также присутствие комплекса Ddc1-Mec3-Rad17. Хотя у мутанта *mec3Δ* в ответ на облучение ИР образуются фокусы Ddc2, последующие этапы чекпойнта не активируются. В случае искусственной колокализации комплексов Mec1-Ddc2 и Ddc1-Mec3-Rad17 киназа CDK1 все еще была необходима для передачи сигнала чекпойнта от сенсоров (Mec1-Ddc2 и Ddc1-Mec3-Rad17) к эффекторной киназе (Rad53) [94]. В отсутствие Ddc1-Mec3-Rad17 не происходит фосфорилирования Rad53, что демонстрирует абсолютную необходимость скрепки для активации Mec1, даже если Ddc2 доставлен в фокус при прохождении S/G2. RPA необходим не только для рекрутирования, но и для удержания комплексов Ddc1-Mec3-Rad17 и Mec1-Ddc2 в сайте повреждения. По-видимому, комплексы CDK1, Ddc1-Mec3-Rad17 и RPA кооперируют при активации чекпойнта в S/G2. Иными словами, для активации Rad53 абсолютно необходим комплекс Ddc1-Mec3-Rad17, и киназная активность CDK1 ответственна за независимое от Ddc1-Mec3-Rad17 рекрутирование Ddc2 в S/G2 [93]. Анализ гибели клеток при облучении ИР показал, что *CDC28/CDK1* взаимодействует эпистатически с генами *RAD17* (скрепка Ddc1-Mec3-Rad17), *RAD24* (загружающий скрепку комплекс Rad24-RFC), *RAD9* (медиатор Rad53), но аддитивно с *RAD53* [95].

Кроме того, CDK1 играет важную роль в формировании Rad9 в качестве медиатора чекпойнта поврежденных ДНК. Rad9 содержит 9 полных (S/T-P-x-K/R) и 11 частичных (S/T-P) консенсусов киназы CDK1 (максимальное число в протеоме дрожжей) [96, 80]. Масс-спектрометрический анализ подтвердил фосфорилирование 15 консенсусов *in vivo* [97, 98, 53]. Мутационные замены 18 CDK1-сайтов в белке Rad9 вызывают утрату адапторной функции и неспособность активировать киназу Rad53. Активация Rad9 включает много этапов, в том числе рекрутирование Rad9 к повреждению ДНК, изменение статуса олигомеризации, фосфорилирование киназой Mec1/Tel1, связывание и активацию Rad53 [99, 38, 35]. В дальнейших исследованиях предстоит выяснить, на каких этапах имеет значение CDK1-зависимое фосфорилирование Rad9. Аналогично у *S. pombe* показано, что BRCT-содержащий чекпойнтный белок Crb2 ортолог Rad9 подвергается CDC2-фосфорилированию [100–102],

и фосфорилирование важно для локализации Crb2 [101]. Предполагается, что это фосфорилирование необходимо для адаптации чекпойнта и репарации [100, 102].

Показано, что сайты фосфорилирования Rad9 участвуют во взаимодействии с белком Dpb11, который рекрутируется комплексом Ddc1-Mec3-Rad17 [22]. Rad9 может взаимодействовать с Dpb11 либо напрямую посредством T462ph и T474ph [103], либо косвенно посредством S11ph [104]. Взаимодействие Dpb11 с Rad9Ser11ph детектируется только после повреждения ДНК.

От киназы CDK1 зависит в основном фосфорилирование N-концевого фрагмента Rad9 (1–231 ост.). В нем сосредоточено около половины (9 из 20) консенсусов фосфорилирования киназой CDK1 (CDK1-9) [105]. Этот фрагмент обозначили как CAD (*Chk1 activation domain*). Сайты CDK1-9 функционируют специфически в отношении второй эффекторной киназы Chk1 в ответ на повреждения ДНК и необходимы для инициации и поддержания активности Chk1 для всех типов ДНК-тропных агентов. Напомним, что для G2/M ареста необходимы два аддитивных пути, зависящих от эффекторных киназ Rad53 и Chk1 [106, 107]. Возможно, поэтому CDC28 взаимодействует аддитивно с RAD53 при облучении ИР.

Отметим, что медиатор Rad9 подвергается CDK1-зависимому фосфорилированию в процессе клеточного цикла в отсутствие повреждений ДНК [99, 108, 109]. При этом по мере прохождения клеточного цикла через S, G2 и M фосфорилирование Rad9 возрастает. В процесс фосфорилирования вовлечены все формы Cdc28/Clb. В фазах S или M наблюдается подвижная форма Rad9 ~ 180–220 кДа (C-Rad9). При повреждении ДНК образуются более крупные формы Rad9 (D-Rad9) [99, 108–110].

По-видимому, существует динамическая ассоциация Rad9 и Chk1 с хроматином, даже в отсутствие повреждений ДНК [107, 111, 112]. В фазах G1 и S/G2 взаимодействие Rad9 с Chk1 не зависит от повреждений и активности CDK1. В G2/M взаимодействие между ними полностью зависит от CAD-Rad9 и активности CDK1. В G2/M киназа CDK1 фосфорилирует CAD и активирует Chk1 через взаимодействие с CAD-Rad9. В ответ на повреждения ДНК CDK1-зависимое фосфорилирование C-концевой области (T125 и T143) позволяет Chk1 переключаться с неактивного в активное состояние [113, 114]. Сочетание низкого уровня стимулирующего фосфорилирования T143ph и высокого уровня ингибирующего фосфорилирования T125ph ограничивает базовый пул Rad9, способный взаимодействовать с Chk1 [115]. Большая часть Rad9 не связана с Chk1 и может образовывать другие комплексы, не содержащие Chk1. Rad9-Chk1 — конститутивный, но минорный комплекс Rad9. Комплекс Rad9-Chk1 рекрутируется вместе с другими комплексами Rad9 к сайту повреждения ДНК, где Rad9 переходит из C- в D-форму, безотносительно к взаимодействию с Chk1. После повреждения ДНК киназа Chk1

взаимодействует только с D-Rad9, в то время как Dpb11 может взаимодействовать с С- и D-формами. Высвобождение Chk1 от Rad9 контролируется обратимым статусом фосфорилирования T125 и T143. Дефосфорилирование T143 и фосфорилирование T125, предположительно, дестабилизируют взаимодействие Rad9-Chk1. Поддержание T143ph в отсутствие T125ph способствует взаимодействию Rad9-Chk1 в проксимальной от повреждения области, где киназа Chk1 может фосфорилировать локальные мишени.

Таким образом, фосфорилирование Rad9 происходит как при повреждении ДНК, так и в отсутствие повреждения в G2/M, когда активность CDK1 наиболее высока. Для активации Rad9 в G1, когда Rad9 имеет низкий уровень CDK1-фосфорилирования, приобретает более важное значение структура хроматина, фосфорилирование H2AX и метилирование H3K79 [33, 116, 117]. В сайте повреждения ДНК активированная киназа Mec1 осуществляет фосфорилирование и ремоделирование обоих белков Rad9 [34] и Chk1 [114]. В результате происходит *цис*-автофосфорилирование Chk1 [118] и последующее высвобождение из комплекса D-Rad9-Chk1, локализованного на поврежденном хроматине. Отметим, что активация киназы Chk1 отличается от активации Rad53, которая включает *транс*-автофосфорилирование вслед за Mec1-зависимым фосфорилированием и специфически взаимодействует с формой D-Rad9, образующейся в ответ на повреждение ДНК [36]. Активная Rad53 освобождается от Rad9 АТФ-зависимым способом [35], который не наблюдается у Chk1.

## СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Вклад киназы CDK1 в регуляцию клеточного цикла посредством химической модификации хромосом мало изучен. К самым известным субстратам киназы относится линкерный гистон H1, который локализуется в линкерной ДНК и связывает соседние нуклеосомы. Структура хроматина у дрожжей менее конденсированная, и линкерный участок короче, чем у млекопитающих (165 п. н. против 205 п. н.). У дрожжей — один гистон H1, а у млекопитающих — 5 вариантов H1.

Отличается и структура гистона. Дрожжевой гистон имеет два глобулярных домена вместо одного. В N-концевой глобуле располагаются сайты связывания с ДНК, в С-концевой — сайты фосфорилирования. Показано, что из 21 потенциального сайта фосфорилирования 6 сайтов фосфорилируются киназой CDK1 [119, 120]. У млекопитающих фосфорилирование гистона, вызывающее деконденсацию хроматина, обнаружено в процессе транскрипции генов и при инициации репликации [121]. У дрожжей линкерный гистон H1 также участвует в регуляции транскрипции [122], HR-репарации [123], активной регуляции хроматиновой структуры высокого порядка [124]. Линкерный гистон взаимодействует с коровым гистоном H4 [122] и компонентом Agr4

трех АТФ-зависимых ремоделирующих хроматин комплексов INO80, SWR1, NuA4 [125].

С другой стороны, к субстратам киназы относятся субъединицы ремоделеров. Ремоделеры принимают участие в узнавании и расчистке ДНК от нуклеосом в процессе репарации. Показано, что субстратом CDC28 является белок Fun30, входящий в SNF2-семейство АТФ-зависимых комплексов ремоделинга хроматина, который отвечает за сайленсинг рДНК в ядре [126, 127]. Негативный регулятор Sip2 киназы Snf1 (субъединица комплекса SWI/SNF) также является субстратом CDC28 [80]. Известно, что предшествующее фосфорилирование белка может облегчать последующую химическую модификацию. Так, фосфорилирование гистона H3 по Ser10 киназой Snf1 облегчает дальнейшее ацетилирование Lys14 ацетилазой Gcn5 (комплекс ремоделинга SAGA) [128, 129]. Выявлено генетическое взаимодействие между генами *CDC28* и *HFI1* (компонент комплекса SAGA), двойная мутация *cdc28-srm hfi1-srm* дает синтетическую леталь [130]. Кроме того, субстратами киназы CDC28 являются белки Ngg1 (SAGA) и Spt16 [80]. Spt16 является транскрипционным фактором элонгации и связывается с НАТ-комплексом NuA3 [131]. Таким образом, вопрос о влиянии киназы CDC28 на структуру хроматина закономерен и нуждается в дальнейшем изучении.

### ФАЗА G1/S

Хотя активация чекпойнта ДНР в фазе G1 не нуждается в киназе CDK1, наблюдается влияние мутации каталитической субъединицы на остановку клеточного цикла в культурах, синхронизованных половым гормоном в фазе G1 [132]. Так, у мутантов *cdc28-srm* наблюдалось снижение задержки клеточного цикла в G0 (с 50 у CDC28 до 18 мин у *cdc28-srm*) и G1 (с 11 до 0 мин) после облучения УФ-светом. К сожалению, у мутанта *cdc28-srm* не определяли киназную активность комплексов CDK1. Увеличенные размеры клеток указывают на вероятные изменения киназной активности, ассоциированной с Cln3, который опосредует контроль размера клеток. Другая мутация *cdc28-5M* не только влияла на остановку, вызванную УФ-повреждениями, но также снижала киназную активность, ассоциированную с циклинами Clb5 и Clb6 [133]. У мутантных клеток *cdc28-as1*, у которых инактивацию киназной активности осуществляли АТФ-аналогом 1-NM-PP1, после индукции ДНР с помощью НО-эндонуклеазы в G1 не наблюдали активацию чекпойнта [83]. Наблюдаемая разница, возможно, связана с различной природой повреждений ДНК.

Можно предположить, что на ранних стадиях клеточного цикла повреждения ДНК могут замедлять вступление в фазу S за счет ингибирования формы киназы CDK1, необходимой для прохождения Старта. G1 чекпойнт может контролировать активность некоторых киназных комплексов посред-



ством регуляции транскрипции G1-циклинов. Действительно, G1-циклины, в норме необходимые для перехода G1/S, инактивируются после повреждения молекул ДНК. Показано, что повреждения ДНК активируют чекпойнтную киназу Rad53, которая фосфорилирует и тем самым инактивирует Swi6, коактиватор транскрипции G1-циклинов *CLN1* и *CLN2* [134, 135]. Гиперэкспрессия циклинов или мутации каталитической субъединицы, повышающие аффинность к G1-циклинам, инактивируют чекпойнт в G1. МД-симулирование структуры мутантной формы киназы Cdc28-*srm* выявило смещение петли PSTAIRE как возможную причину модификации взаимодействия с циклинами [136]. В фазе G1 киназа CDK1 выступает главным образом в качестве эффектора чекпойнт-регуляции.

## ФАЗА S

Чекпойнт-зависимую остановку деления клетки в фазе S вызывает ГМ, подавляющая репликацию ДНК в результате истощения пула предшественников нуклеотидов, преимущественно в результате ингибирования рибонуклеотидредуктазы (РНР) [137]. В литературе данные об участии CDC28 в S чекпойнте отсутствуют. Прямое изучение функционирования киназы показало, что CDC28 не влияет на активацию чекпойнта в фазе S. Синхронизация *cdc28-as1* клеток в фазе S не привела к повышению чувствительности к летальному действию ГМ или метилметансульфоната (ММС) и не повлияла на образование Ddc2-центров [138]. Это согласуется с представлением, что киназа CDC28 сама по себе не является существенной для активации Rad53 в этой фазе клеточного цикла [92]. Однако хотя на частоту образования Ddc2-фокусов активность CDC28 не влияла, интенсивность Ddc2-фокусов была ниже в клетках *cdc28-as1* в присутствии 1-NP-PP1. Кроме того, от CDC28 зависела активация Rad53 УФ-миметиком 4-нитрохиолин-1-оксидом (4-NQO) [83] и ММС [138]. Фосфорилирование Rad53, индуцированное флеомицином, было частично снижено у клеток мутанта *cdc28-as1*, обработанных 1-NP-PP1 [138]. По-видимому, активация чекпойнта повреждениями ДНК, индуцированными флеомицином, частично зависит от CDC28.

Мутации *cdc28-srm* [132], *cdc28-5M* [133] и *cdc28-Y19F* или ингибирование киназной активности [139] также не влияют на S чекпойнт, но наблюдалось небольшое влияние мутаций *cdc28-srm*, *cdc28-5M* и *cdc28-as1* на чувствительность к ГМ [132, 138]. Мутация *cdc28-srm* влияет также на чекпойнт-зависимую остановку деления в поздней S/G2 и в G2 фазах у репликативных мутантов *cdc6-1* и *cdc9-1* соответственно [132]. Возможно, что влияние CDC28 на чекпойнт в фазе S пока недостаточно изучено.

Длительная остановка репликативной вилки может приводить к коллапсу и возникновению ДНР. После обработки ГМ часть клеток *cdc28-5M* содер-

жит фракцию суб-G1-ДНК, что свидетельствует о митотической катастрофе и согласуется с предположением об участии CDC28 в предотвращении митотической катастрофы [140].

**Поздние *ori*.** Включение *ori*-репликации ингибируется в процессе фазы S, если повреждения ДНК или застрявшая репликативная вилка активируют чекпойнт-киназы. Rad53 подавляет активацию поздних *ori*-репликации [141, 142] на стадии после образования пререпликативного комплекса (пре-РК), но до образования преиницирующего комплекса (пре-ИК) [7]. Чекпойнт-киназа Rad53, так же как и в фазе G1, ингибирует оба CDK1- и DDK-зависимые киназные пути, которые с избытком блокируют дальнейшее включение *ori* [142]. Rad53 действует на DDK напрямую, физически взаимодействуя и фосфорилируя ее субъединицу Dbf4 (ГМ-индуцированное гиперфосфорилирование Dbf4 зависит от Rad53 и Mec1), что способствует ингибированию киназы DDK и удалению ее из хроматина [143–146]. В то же время CDK1-путь блокируется Rad53-опосредованным фосфорилированием субстрата CDK1, Sld3. Это позволяет CDK1 в присутствии повреждения ДНК сохранять активность в фазе S, которая критична для предотвращения повторной загрузки Mcm2-7 на уже открытые *ori*-репликации. Таким образом, замедление фазы S в случае *intra-S* чекпойнта прежде всего обусловлено подавлением активации *ori*-репликации (см. рисунок).

**Теломеры.** Инактивация кэп-комплекса вызывает оголение теломеры, сопровождающееся деградацией теломерной ДНК. Накопление онДНК сверх порогового значения вызывает ответ клетки на повреждения ДНК и остановку цикла деления в G2/M [8, 9, 147].

Комплекс CST (Cdc13-Stn1-Ten1) является эволюционно консервативным RPA-подобным комплексом, связывающимся с теломерным 3'-хвостом онДНК [8, 148, 149]. Полагают, что CST предотвращает процессинг теломерной онДНК, подобно RPA в случае ДНР [150]. Cdc13 связывается с G-богатой онДНК и защищает противоположную C-богатую цепь от деградации. Аллель *cdc13-1 ts* позволяет изучать поведение некэпированных теломер в различные моменты клеточного цикла, а также степень деградации теломер и жизнеспособность клеток. Оказалось, что некэпированные концы хромосом стабильны в G1-арестованных клетках, причем клетки сохраняли высокую жизнеспособность [147]. Однако в клетках, арестованных в G2/M, теломерная ДНК подвергалась интенсивной деградации, и клетки со временем гибли. Таким образом, отсутствие расщепления C-конца теломер в G1 имеет сходство со стабильностью индуцированных HO-эндонуклеазой концов ДНР в G1-арестованных клетках [151] и с неспособностью процессировать такие ДНР, обусловленной отсутствием активности Cdc28/C1b в этот момент [83, 152]. Таким образом, процессинг как нефункциональных теломер, так и случайных ДНР активностями репарации ДНК регулируется способом, зависящим от клеточного цикла и CDK1 (Cdc28/C1b). Cdc13 является субстратом киназы

CDK1 [7]. Оголенные теломеры узнаются комплексом Ddc1-Mec3-Rad17. В деградации неэкспонированных теломер участвуют Eho1 и Sgs1, а также другие нуклеазы. В расщеплении незащищенных теломер, но не концов ДНР, участвует 5'-3'-геликаза Pif1. В клетках почкующихся дрожжей комплекс CST играет двойную роль — ингибирование ответа на повреждения ДНК, как ассоциированного с ДНР и активируемого Eho1, так и ассоциированного с репликацией и иницируемого геликазой Pif1 [153]. Иными словами, ответ на незащищенных теломерах частично обусловлен сходством с ДНР, а с другой стороны — дефектом репликации ДНК.

В результате деградации образуется протяженный трэк онДНК, который вызывает утрату жизнеспособности и стимулирует Mec1-зависимую активацию чекпойнта и арест клеточного цикла, аналогично ответу на ДНР [8, 154, 155]. MRX подавляет деградацию, привлекая протекторные теломерные белки (теломеразы). Деградация нуклеазой Sae2, по-видимому, стимулирует нуклеазную активность Mre11. В результате инцизии 3'-нити происходят высвобождение комплекса MRX от ДНР и активация Mec1-зависимого ответа [92]. И, наоборот, в отсутствие деградации комплекс MRX сохраняет стабильную связь с ДНР и служит стимулом для активации чекпойнта киназой Tel1 через свою субъединицу Xrs2 [156, 157]. Затем Tel1 аналогично Mec1 активирует чекпойнт, рекрутируя медиатор Rad9 и активируя последующий киназный каскад [157]. Tel1, по-видимому, имеет дополнительную роль в деградации ДНР [48].

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Программа транскрипции в процессе клеточного цикла определяет порядок событий клеточного цикла и является мишенью сигналов, регулирующих прохождение клеточного цикла, в том числе чекпойнт-регуляцию. Чекпойнт-ответ включает в себя индукцию транскрипции генов, осуществляющих стабилизацию репликативной вилки в случае нарушения репликации или репарацию. Транскрипционный ответ осуществляют киназы Mec1, Rad53 и фосфорилируемая ею киназа Dun1.

Экспрессия G1/S генов регулируется двумя транскрипционными факторами — SBF и MBF, имеющими одну общую субъединицу Swi6 и, соответственно, два белка Swi4 и Mbp1, связывающихся со специфическими последовательностями ДНК. SBF функционирует в основном как транскрипционный активатор в G1, MBF осуществляет регуляцию транскрипции при переходе G1/S. Причем гены, участвующие в своевременности и эффективности событий начала клеточного цикла, регулируются, главным образом, SBF, в то время как гены, участвующие в инициации репликации ДНК и синтезе нуклеотидов, чаще контролируются фактором MBF.

В ранней фазе S киназы Cdc28/Cln1 и Cdc28/Cln2 активируют MBF (Swi6/Mbp1), фактор транскрипции циклинов Clb5 и Clb6 и других генов репликации ДНК. Циклины Clb5 и Clb6 участвуют в сборке пре-ИК, активируя CDK1/Clb-зависимое фосфорилирование белков Sld2 и Sld3 [7]. Так как S-CDK управляют вступлением и прохождением фазы S, они являются привлекательными мишенями чекпойнта. Действительно, было показано, что S-циклины Clb5 и Clb6 регулируются в ответ на генотоксический стресс [158]. Нестабильный Clb6, рано элиминирующийся в условиях невозмущенной фазы S, стабилизируется в ответ на генотоксический стресс. Для стабилизации необходима киназа Rad53 (но не киназа Dun1), транскрипционный фактор MBF и активный синтез белка *de novo*. Swi6, трансактивационная субъединица MBF, сохраняет ядерную локализацию в клетке в условиях генотоксического стресса, несмотря на наличие Clb6. CDK1/Clb6, но не CDK1/Clb5, опосредует выведение Swi6 из ядра в невозмущенной фазе S как часть регуляторного контроля активности MBF [159]. Однако S чекпойнт отменяет такой контроль. Известно, что Rad53 фосфорилирует Swi6 [135], Clb6 также является субстратом Rad53 *in vitro*. Вполне вероятно, что фосфорилирование киназой Rad53 таких субстратов, как Swi6 и Clb6, нарушает их аффинность, делая возможным ядерную локализацию Swi6.

В клетках обнаруживаются две формы циклина Clb5. Устойчивый уровень Clb5 в невозмущенной фазе S обеспечивается балансом между продолжающимся синтезом и деградацией нестабильной формы белка. В противоположность истощению *CLB6*-мРНК в фазе S, *CLB5*-мРНК продолжает присутствовать, обеспечивая необходимые матрицы для продолжающегося синтеза белка. Более того, в противоположность Clb6 уровень Clb5 остается постоянным даже в условиях блока белкового синтеза или при сверхэкспрессии гиперстабильного репрессора транскрипционного фактора MBF. В противоположность *CLB6*-мРНК уровень *CLB5*-мРНК не увеличивается в ответ на репликационный стресс. Иными словами, хотя *CLB5*-мРНК постоянно присутствует в течение кризиса репликации, синтез Clb5 не происходит. В ответ на генотоксический стресс стабилизируется пул нестабильной формы Clb5. Можно предположить, что реактивация MBF в ответ на генотоксический стресс происходит только у некоторых генов, которые экспрессируются под контролем MBF в Старте. Данные о регуляции S-циклинов Clb5 и Clb6 в ответ на генотоксический стресс дополняют данные о чекпойнт-контроле регулятора DDK-киназы Dbf4 и субстрата CDK1 — Sld3, также необходимых для инициации и прохождения фазы S [146].

Известно два транскрипционных репрессора — Whi5 и Nrm1 транскрипционных факторов SBF и MBF [160–162]. Репрессор Whi5 подавляет SBF-зависимую транскрипцию в ранней G1 до вступления в новый цикл деления, а Nrm1 служит корепрессором MBF вне фазы G1. Гены, экспрессия которых зависит от фактора MBF (но не SBF), по-видимому, регулируются

репликативным чекпойнтом. В ответ на репликативный стресс в клетке поддерживается MBF-зависимая транскрипция, а Nrm1 инактивируется способом, зависимым от киназы Dun1, в свою очередь активируемой киназой Rad53 [163]. Примером транскрипционного ответа также служит инактивация Dun1-зависимым фосфорилированием транскрипционного репрессора Crt1, ведущая к активации генов, индуцированных повреждениями ДНК [164]. Однако регуляция экспрессии индуцибельных повреждениями ДНК генов сложна и включает другие транскрипционные факторы [165]. Упомянутый путь влияет только на относительно небольшую часть из > 200 транскриптов, индуцируемых генотоксическим стрессом. Отметим, что чекпойнт поврежденный ДНК включает регуляцию синтеза рибонуклеотидредуктазы для синтеза большого количества дНТФ, в результате фосфорилирования киназой Dun1 и деградации ингибитора Sml1 [166–168].

## ФАЗА G2

В G2/M-арестованных клетках для полной активации Rad53 ДНР, индуцированными ИР и НО-эндонуклеазой, необходима активность CDK1 [83]. Это связано с процессированием концов ДНР. Кроме того, активация Rad53 в результате искусственной колокализации сенсоров чекпойнтов (в отсутствие повреждения ДНК) нуждается в CDK1-зависимом фосфорилировании Rad9 в G2/M-арестованных клетках [93]. С другой стороны, ингибирование CDK1 не блокирует ГМ-индуцированную активацию Rad53 [138, 169], и для активации Rad53 ММС не нужна активность CDK1 в течение G2/M [83]. Таким образом, реакция на различные повреждения или на ДНР на различных стадиях клеточного цикла отличается. Так, ДНР, возникшие в G2/M, приводят к умеренной активации чекпойнта, а ДНР, возникшие в течение фазы S, приводят к более сильной активации чекпойнта застрявшей репликативной вилкой [170]. По-видимому, активация чекпойнта застрявшей репликативной вилкой либо не требует активности CDK1, либо чекпойнтный ответ настолько сильно выражен, что перекрывает необходимость в CDK1.

В экспериментах с мутацией *cdc28-srm* не было обнаружено нарушений G2 чекпойнта, индуцированного ИР-повреждениями ДНК и блоком репликации (ГМ), но нарушения G2 остановки наблюдались у репликативных мутантов *cdc6-1* и *cdc9-1* при непермиссивной температуре. Однако использование мутации *cdc28-as1* [F88G] показало, что в фазе G2 для активации Mec1-зависимой остановки индуцированным НО-эндонуклеазой ДНР требуется CDC28 [83]. Более того, у мутанта *cdc28-5M*, у которого отсутствовала остановка клеточного цикла, индуцированная повреждением ДНК, наблюдалось снижение киназной активности, ассоциированной с Clb2 и необходимой для выхода из митоза [133]. Таким образом, различные аллели

киназной субъединицы вызывают различные последствия дисфункции CDC28 и различные фенотипические проявления. Представляет интерес изучение связи между особенностями структурной организации киназы и ее функционированием.

## МИТОЗ

В клетках почкующихся дрожжей митоз регулируется в нескольких точках. Сборка веретена контролируется в G1 вскоре после Старта, а митотическая сегрегация хромосом контролируется позднее на границе «метафаза–анафаза». При неправильной сборке веретена или при отсутствии связи между микротрубочками и кинетохорами осуществляется задержка перехода в анафазу. Кроме того, контролируется также выход из митоза. Различные стадии митоза оркеструются двумя или более комплексами CDC28/B-циклин. Некоторые из этих форм (CDC28/C1b3 и CDC28/C1b4) необходимы для инициации митоза и образования митотического веретена, другие (CDC28/C1b1 и CDC28/C1b2) необходимы для выхода из митоза и завершения клеточного цикла.

Для прохождения границы между метафазой и анафазой требуется деградация ингибитора расхождения сестринских хроматид Pds1. Митотическая форма CDK1 участвует в активации протеасомы APC/C<sup>Cdc20</sup> в результате фосфорилирования регуляторной субъединицы Cdc20 и последующей убиквитин-зависимой деградации анафазного ингибитора Pds1 и циклинов C1b5 и C1b3. Чекпойнт повреждений ДНК вызывает замедление митоза посредством ингибирования убиквитинизации Pds1, в результате фосфорилирования секурина Pds1 киназой CDK1 [171]. Фосфорилированный секурин Pds1 удерживает сепаразу Esp1 [172], необходимую для расщепления одной из субъединиц когезинового комплекса (Med1p-Scc1p), ответственного за когезию хроматид. Второй путь включает Rad53-зависимое фосфорилирование Cdc20, которое ингибирует взаимодействие между Cdc20 и Pds1 [173] и также опосредует индуцибельное фосфорилирование субъединицы когезинового комплекса [135].

S-специфические циклины C1b5,6 в ранней фазе S обеспечивают загрузку когезиновых комплексов на хроматин. В невозмущенной фазе S этот механизм действует параллельно с Pds1 для обеспечения когезии и достаточен для поддержания сестринских хроматид вместе. В случае нарушения прохождения репликативной вилки обе функции — эффективная загрузка когезина (функция C1b5 и C1b6) и защитная (функция Pds1) — необходимы для успешной когезии [174].

Выход из митоза ассоциируется с инактивацией Cdc28/C1b2. В условиях остановки клеточного цикла в G2/M киназа Rad53 поддерживает высокую

киназную активность CDK1 посредством ингибирования киназы Cdc5, участвующей в деградации циклинов и в выходе из митоза [171].

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ

При активации чекпойнта ДНР клетки остаются арестованными длительное время около шести циклов деления (12–15 ч). При этом основной механизм остановки — предотвращение деградации секурина Pds1 комплексом APC<sup>Cdc20</sup>. Возобновление деления в случае репарации повреждения называется *восстановлением*. Однако даже в отсутствии репарации клетки способны отключить чекпойнт и возобновить деление с помощью механизма, названного *адаптацией* [84, 175–177].

Восстановление от чекпойнта осуществляют фосфатазы Ptc2, Ptc3 и Pph3 в результате дефосфорилирования Rad53 [42, 178]. Клетки дикого типа восстанавливаются спустя 40 мин после 3-часовой инкубации с ГМ и, как показывает FACS анализ, завершают полный синтез ДНК [138]. В клетках дикого типа киназа Rad53 в основном дефосфорилирована спустя 1 ч после освобождения от ГМ-ареста и почти полностью дефосфорилирована спустя 2 ч после высвобождения. Мутант *cdc28-5M* также завершал синтез ДНК спустя 40 мин, но выход из фазы М проходил медленнее, чем в клетках дикого типа. У мутанта *cdc28-as1* степень дефосфорилирования Rad53 соответствовала таковой у клеток дикого типа.

Появились данные о фосфорилировании Rad53 киназой CDK1. Rad53 имеет 13 сайтов автофосфорилирования и 14 сайтов фосфорилирования киназами, в том числе Mec1, Cdc5 и CDK1 [39]. Активность киназы Cdc5, активирующей выход из митоза, ограничивается фазами G2/М. В ответ на повреждения ДНК эта киназа фосфорилируется Rad53-зависимым способом [179]. Было показано, что Cdc5 необходима для адаптации [176]. Фосфорилирование С-конца Rad53 по S774 киназой CDK1 и S789, S791 киназой Cdc5 зависит от фазы клеточного цикла, обнаруживается в отсутствие повреждения в фазах G1, G2 и М и имеет пик фосфорилирования в митозе. Фосфорилирование не влияет на активацию чекпойнта [180, 181], но предотвращает адаптацию чекпойнта [180], а также важно для функционирования Rad53 в регуляции морфогенеза клетки [181], обеспечивающего выживаемость клетки в процессе репликативного стресса. Предполагается, что это дополнительное фосфорилирование обеспечивает тонкую настройку уровня фосфорилирования Rad53, от которого зависит активация киназы Rad53, ее поддержание и адаптация. В фазе S в отсутствие дополнительного фосфорилирования киназа менее чувствительна к онДНК, возникающей в процессе репликации, наблюдается менее сильный ответ на повреждения ДНК [182, 183]. В то же время она высокочувствительна к повреждениям ДНК в G2/М. Клетки дикого

типа могут адаптироваться в G2/M при наличии одного, но не двух поврежденных ДНК [9].

## МОРФОГЕНЕЗ И ЦИТОКИНЕЗ

**Почкование.** Ключевая контрольная точка в процессе почкования располагается в Старте, в этой точке на инициацию образования почки влияют состав среды и половые феромоны. Второй важный момент контроля, названный *чекпойнтом почкования*, координирует образование и рост почки с последующими процессами ядерного деления. Этот чекпойнт регулирует переключение киназы с формы G1 (Cdc28/Cln) на G2 (Cdc28/Clb). Для возникновения почки, начиная с конца фазы G1, необходима стабильная поляризация актинового цитоскелета, и этот процесс контролируется циклинами Cln1,2. В G1 происходит фосфорилирование киназой Swe1 тирозина 19 (CDK1Y19ph). В G2 его дефосфорилирование фосфатазой Mih1 вызывает увеличение киназной активности. В случае нарушения почкования (например, у мутанта *cdc24-ts*) для морфологического чекпойнта фосфорилирование тирозина Y19 критично. Чекпойнт замедляет деление ядра в G2 примерно на 2 ч (время одного клеточного деления) и предотвращает возникновение биядерных клеток. Задержка клеточного деления полностью отсутствует при введении мутации *cdc28-Y19F*, предотвращающей фосфорилирование тирозина, или при сверхэкспрессии *MIH1* [139]. Кроме того, фенотип апикального роста и задержка деления ядра частично супрессируются делецией *SWE1* или сверхэкспрессией гена *CLB2*.

CDK1 участвует не только в инициации и поддержании поляризованного роста, но и в доставке везикул с белками, необходимыми для роста мембраны. Везикулы — это пузырьки, которые образуются из мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) и содержат ферменты, доставляемые в разные отделы клетки, например, к месту роста почки. Таким образом, CDK1 играет важную роль в координации роста клеточной стенки с прохождением клеточного цикла [184].

Механизм ингибиторного фосфорилирования высоко консервативен и контролирует деление ядра у других эукариот, включая *S. pombe*, у которых этот путь регулирует чекпойнт репликации ДНК, а также известна его роль в чекпойнте полярности клеточного роста [185, 186]. Активация чекпойнта у дрожжей *S. pombe* и высших эукариот происходит в результате ингибирования CDK1 посредством регуляции фосфатазы Cdc25 и смещения баланса от активной дефосфорилированной формы к неактивной фосфорилированной форме CDK1Y19ph. Более того, у высших эукариот для дальнейшего ингибирования активности CDK1 активируется белок p53, вызывающий индукцию экспрессии ингибиторов киназы CDK1, таких как p21. Однако клетки дрож-



жей *S. cerevisiae* обычно останавливают цикл деления при высокой активности CDK1, и ингибиторное фосфорилирование CDK1Y19ph не требуется для эффективной остановки клеточного цикла [139, 187].

Эукариотическая клетка содержит различные макромолекулярные структуры, такие как актин, тубулин, промежуточные филаменты, септиновый цитоскелет, необходимые для морфогенеза, транспорта везикул, деления ядра и цитокинеза. Что сканирует морфологический чекпойнт? Показано, что одной из таких структур является септин [188]. Септиновые мутанты останавливают деление в фазе апикального роста и проявляют задержку ядерного деления, демонстрируя задержку активации G2-киназы. С другой стороны, в случае нарушения процесса возникновения почки в клетках *cdc24-ts* наблюдается нарушение распределения септина.

Септиновые белки (Cdc10, Cdc11, Cdc12, Cdc3) образуют блоки, из которых собираются филаменты, образующие платформу для сборки других белков (например, Myo1), и кольцевую структуру, являющуюся диффузным барьером, важным для поляризованного роста. Септин участвует в поддержании асимметричного распределения некоторых растворимых белков, таких как Myo2, Sec3, Spa2, необходимых для поляризованного роста почки [189], а также способствует компарментализации мРНК [190, 191]. Септиновый обруч нужен для сборки актомиозинового кольца (АК) в перешейке, но не для его стабилизации или сужения. АК собирается на ранней стадии клеточного деления в сайте почкования. В поздней анафазе Myo1-зависимым способом присоединяется F-актин (Act1) и белок Igg1. В конце анафазы происходит сжатие АК, зависимое от F-актина. Активность сжатия кольца регулируется системой выхода из митоза MEN (*mitotic exit network*), которая обеспечивает инактивацию CDK1, ингибирующую сжатие кольца.

При сборке септина чекпойнт осуществляет мониторинг, координирующий сборку цитоскелета и начало митоза [188, 192]. Ключевыми ферментами являются киназы Hsl1, Gin4 и Kcc4 [188, 193–196]. Все эти киназы локализованы в кольце перешейка, в сайте локализации септина. После сборки септина Hsl1 активируется и запускает вступление в митоз в результате ингибирования Swe1 [188, 192]. Киназы фосфорилируют и инактивируют Swe1, что приводит к активации Cdc28/Clb киназ, индукции митоза и изотропному росту. Клетки, не способные к сборке септина или утратившие киназы, имеют продолжительную фазу G2 и характеризуются гиперполяризацией. Этот фенотип супрессируется делецией *SWE1*.

Обнаружен простой механизм, позволяющий киназам определять степень сборки септина [197]. Киназа Hsl1 — большой белок (~ 1500 ост.). В N-концевом участке располагается киназный домен (370 ост.), а в C-концевом участке — ингибирующий домен (987–1100 ост.), который связывается с киназным доменом и его ингибирует (автоингибирование). В этой же области, вблизи или перекрывая этот домен, лежат сайты связывания с септинами

Cdc12 (987–1100 и 1282–1400 ост.) и Cdc11 (1000–1282 ост.). Связывание с несколькими септинами приводит к активации Hsl1, обеспечивая, таким образом, прохождение клеточного цикла. Гомологи Hsl1, Gin4 и Kcc4 также взаимодействуют с септинами (Cdc3 и Cdc11/Cdc12 соответственно) [194, 198]. Авторы предполагают, что все три киназы взаимодействуют с септинами и активируются аналогичным способом. Соответствующая организация септинов позволяет клеткам вступать в следующую фазу клеточного цикла. Действительно ли при организации других компонент полярности, таких как актин, происходит мониторинг в процессе клеточного цикла, является важным, но нерешенным вопросом.

Таким образом, прямой мишенью морфологического чекпойнта является киназа Swe1, ингибирующая активность CDK1. Однако этот механизм не функционирует в случае чекпойнта центриольных пластинок [199] или чекпойнта, индуцированного повреждениями ДНК [200], который также осуществляет остановку в G2. Существует еще чекпойнт целостности клеточной стенки [201].

**Движение ядра.** Недавно обнаружен цитоплазматический сигнал чекпойнта, контролирующего положение ядра [76]. Предполагается, что в чекпойнтной остановке перед анафазой существуют два компонента: один — подавление расхождения хромосом (Pds1), второй — предотвращение динеин-зависимого движения веретена в почку, которое происходит в норме в анафазе. В норме в митозе взаимодействие пула веретена с кортексом почки активирует систему выхода из митоза MEN [202, 203], включающую фосфатазу Cdc14, которая запускает телофазу и прохождение в следующий цикл деления клетки. В ответ на повреждения ДНК Mec1-зависимый чекпойнт через Rad53 и Chk1 репрессирует передвижения ядра, ассоциированные в норме с выходом из анафазы. У одиночных мутантов в отсутствие полноценного чекпойнт-ответа аппарат цитоплазматического микротубулина осуществляет ориентацию и движение ядра по направлению к кончику почки. Если полярное тело веретена SPD (*spindle pool body*) достигает кортекса почки, а внутриядерный чекпойнт еще в силе, Cdc14 может не активироваться и преанафаза продолжится, приводя в результате к миграции веретена, двигающегося взад-вперед и пересекающего перешеек почки. В норме сепараза Esp1 удерживается в цитоплазме вплоть до анафазы, а поступление ее в ядро облегчается Pds1 [173], но, вероятно, есть и другой контроль транспорта, для которого требуется Rad53 и/или Chk1 [204]. Цитоплазматическая роль Rad53 проявляется также в регуляции морфологических событий при репликативном стрессе, включая фосфорилирование септина и деградацию киназы Swe1 [53, 205]. Нарушение Mec1 приводит к полному устранению задержки. Мутации *rad53Δ*, *chk1Δ* и *pds1Δ* вызывают лишь частичное сокращение остановки, и только у тройного мутанта остановка отсутствует полностью. По-видимому, Rad53 и Chk1 имеют другие

мишени помимо секурина. Киназа CDK1 принимает участие в регуляции активности Esp1 и Rad53.

**Сегрегация митохондрий.** Процесс деления клетки у почкующихся дрожжей асимметричный, и передача органелл дочерней клетке представляет собой активный процесс сегрегации. Равномерное распределение органелл между материнской клеткой и почкой обусловлено движением (ретроградное и антероградное) митохондрий вдоль актиновых нитей и закореванием части органелл в противоположных вершинах почки и материнской клетки. Этот процесс скоординирован с прохождением клеточного цикла. Дефекты в наследовании митохондрий блокируют прохождение клеточного цикла, а именно цитокинез. У мутантов с дефектом наследования митохондрий (*mdm10Δ* и *mmr1Δ gem1Δ*) возникают клетки с множественными почками [206, 207]. Мутант вступает в G2 на 20 мин позднее, чем дикий тип. Образование второй почки происходит через 150 мин после высвобождения от ареста в G1 и спустя 25 мин после образования первой почки. Этот фенотип обусловлен дефектом цитокинеза [207]. Показано участие MEN в цитокинезе и чекпойнте наследования митохондрий. В клетках *mdm10Δ* наблюдается дефект высвобождения из ядрышка центрального игрока MEN фосфатазы Cdc14, что влияет на его способность активировать субстраты в перешейке почки и SPB. Высказано предположение о существовании системы контроля, которая ингибирует сжатие кольца между клеткой и почкой, если имеются дефекты наследования митохондрий. Известно, что некоторые компоненты MEN локализованы в сайте сборки кольца [208–211]. Делеция *BUB2*, гиперактивирующая MEN, супрессирует нарушение цитокинеза у мутантов *mdm10Δ* и *mmr1Δ gem1Δ*. Условия, подавляющие функционирование MEN при выходе из митоза (мутации, ослабляющие взаимодействие Cdc14 с ингибитором Cfi1/Net1, сверхпродукция ингибитора SIC1 киназы CDK1 или мутации, ингибирующие экспорт Cdc14 из ядра в цитоплазму) приводят к дефектам цитокинеза [208, 211–215]. MEN может контролировать цитокинез, направляя вовлеченные в образование септы белки к перешейку почки [216–218].

Контролируется не только наследование митохондрий, но и их качество. Было показано, что митохондрии с низким мембранным потенциалом предпочтительно остаются в материнской клетке [219]. Механизм неизвестен, но учитывая способ движения митохондрий в дочернюю клетку, предложена следующая модель. Для направленного антероградного движения митохондрий в почку требуются актиновые нити. Митохондрия, которая двигается из материнской клетки в почку, плывет вверх по течению, преодолевая противоположный ретроградный поток. Предполагается, что только высоко функциональные митохондрии, которые обладают антероградной силой, достаточной для преодоления противоположного ретроградного потока, будут передаваться и сохраняться в развивающихся дочерних клетках в процессе наследования.

Оказалось, что контролируется не только наследование и качество митохондрий, но и количество мтДНК [220]. Утрата мтДНК (но не нарушение дыхания) у  $\rho^0$ -мутантов приводит к нарушению прохождения G1/S. После высвобождения от ареста в G1 клетки  $\rho^+$  проходят G1/S через 40–60 мин, а S/G2 через 100–120 мин. Однако половина клеток  $\rho^0$  не могут пройти G1/S, а остальные клетки  $\rho^0$  делятся с низкой скоростью. Они проходят G1/S через 60–100 мин, а S/G2 через 150 мин. Таким образом, утрата мтДНК приводит к нарушению прохождения G1/S. Для этой остановки необходима киназа Rad53.

МтДНК синтезируется на протяжении всего клеточного цикла, и ее количество контролируется. Rad53 регулирует копийность мтДНК двумя способами. Первый путь — влияние на пул дНТФ посредством регуляции активности РНР [3]. Низкий уровень активности РНР (или дНТФ) приводит к повышению потери мтДНК, в то время как высокий уровень дНТФ понижает потерю мтДНК и увеличивает копийность мтДНК [221–223]. Второй путь — участие Rad53 в передаче сигнала чекпойнта [222]. Функция чекпойнта повреждений ДНК в контроле количества мтДНК консервативна. Так, нейродегенеративное заболевание атаксия-телеангиоэктазия, вызванное мутацией в гене другой чекпойнтной киназы ATM, характеризуется снижением копийности мтДНК в клетках пациентов, а также у мышеч при нокауте гена ATM, и в фибробластах, обработанных ингибитором ATM KU-55933 [224]. Поскольку изменения содержания мтДНК связаны со многими формами рака, а в раковых клетках человека обычно обнаруживают нарушения белков чекпойнта повреждений ДНК, возможно, что изменения в метаболизме раковых клеток, такие как эффект Варбурга (понижение митохондриального дыхания и повышение анаэробного гликолиза), возникают в результате дерегуляции чекпойнта мтДНК.

Предполагается, что утрата мтДНК активирует киназу Rad53, ингибирующую прохождение G1/S. Влияние Rad53 на G1-остановку у  $\rho^0$  не связано с влиянием на пул дНТФ. К субстратам Rad53 относится геликаза Pif1, фосфорилируемая у  $\rho^0$ -мутантов. Геликаза Pif1 функционирует как в ядре, так и в митохондриях [225]. Ядерная форма Pif1 участвует в формировании и удлинении теломер, репликации рекомбинантных молекул ДНК, синтезе фрагментов Оказаки, предотвращении реорганизации хромосом и репарации ДНК. Ядерный пул Pif1 подвергается фосфорилированию при активации Rad53 повреждениями ДНК [226]. Митохондриальный пул Pif1 локализован в нуклеоидах и необходим для поддержания мтДНК. Нуклеоид является единицей наследования мтДНК и представляет собой нуклеопротеиновый комплекс, расположенный в матриксе и взаимодействующий с внешней и внутренней митохондриальными мембранами. Для равномерного распределения митохондрий необходимо их правильное взаимодействие. Прикрепление нуклеоида к мембране митохондрий обеспечивает наследование мтДНК при

сегрегации митохондрий. Хотя все нуклеоиды содержат мтДНК и белок упаковки Abf2, только активно реплицирующиеся нуклеоиды содержат белок Mgm101, опосредующий рекомбинацию ДНК и существенный для поддержания мтДНК [227]. Этот белок гомологичен консервативным белкам рекомбинации, необходим для рекомбинации повторов ДНК и для репарации окислительных повреждений мтДНК [227–229]. В нуклеоид входят ферменты транскрипции, репликации, репарации и рекомбинации. У  $\rho^+$  клеток, имеющих нуклеоиды, не наблюдается чекпойнт-остановка. У клеток  $\rho^0$  нет нуклеоидов, и Rad53 каким-то образом это определяет. Скрининг генома показал генетическое взаимодействие *RAD53* и генов репарации ДНК, таких как *RAD6* и *RAD27*, с генами поддержания мтДНК, включая *MMM1*, *MMM2*, *MDM10*, *MDM12*, *MDM32* [230]. Выявлено влияние CDK1 на сегрегацию митохондрий [231].

**Сегрегация ЭР.** Существует ядерный (яЭР) и кортикальный (кЭР) эндоплазматический ретикулум. Наследование яЭР обусловлено его связью с оболочкой ядра, поэтому в процессе деления клетки ядро тащит яЭР за собой. Наследование кЭР — более сложный, многоступенчатый процесс, который зависит от актинового цитоскелета и регулируется клеточным циклом. Трубки кЭР двигаются в маленькую почку  $\text{Muo4}$ -зависимым способом. В вершине почки они сначала заякариваются, а позднее распределяются вокруг по периферии всей почки. Разрушение белков *Sce1* или *Ice2*, опосредующих заякоривание кЭР в вершине почки, приводит к дефектам клеточной элонгации, организации септинов в перешейке и гиперактивации *Swe1* [232]. *Swe1*, ингибитор киназы CDK1, регулирует прохождение G2/M посредством морфологического чекпойнта. Септины обеспечивают платформу для закрепления в перешейке многочисленных белков, вовлеченных в прохождение клеточного цикла, и доставка *Swe1* к этой платформе определяет ее деградацию [233]. Таким образом, нарушение сборки септинов в перешейке почки в результате дефекта распределения кЭР препятствует подавлению *Swe1* и приводит к его гиперактивации, которая запускает морфологический чекпойнт в G2/M. Отсюда и удлиненный фенотип клеток, наблюдаемый при нарушении наследования кЭР, поскольку переключение от апикального к изотропному росту почки происходит в G2/M.

Почкующиеся дрожжи обладают механизмом контроля наследования кЭР и регуляцией прохождения клеточного цикла в ответ на его дефекты. Этот путь замедляет цитокинез, вероятно, изменяя динамику комплекса септинов, и ингибирует наследование кЭР в ответ на ЭР-стресс. В результате, в условиях стресса происходит преимущественное расположение кЭР в материнской клетке и замедление цитокинеза до восстановления функции ЭР. При этом контроль качества в процессе наследования ЭР влияет на жизнеспособность клеток. Мутации, которые подавляют этот чекпойнт и позволяют наследовать компромиссный ЭР, снижают продолжительность жизни [234].

Часть Cdc28 тесно сцеплена с матриксом цитоскелета [235] и ЭР [236]. Актиновый цитоскелет и ЭР в некоторой степени колокализваны, и динамика ЭР зависит от цитоскелета [237]. Подвижность и структура митохондрий также зависят от цитоскелета [238] и могут влиять на изменения в структуре ЭР [239]. Cdc28 и Cln3 связываются с ЭР в местах, контактирующих с цитоскелетом, что, вероятно, способствует участию киназы CDK1 в морфогенезе, например, биогенезе вакуолей и митохондрий. Действительно, субстратом киназы является белок Bem1. Белки Bem1, Cdc24, Cdc42 локализованы в сайте почкования и реорганизуют актиновый цитоскелет для установления поляризации [240]. Cdc28/Cln3 регулирует биогенез вакуолей Bem1-зависимым путем [241]. Таким образом, наследование органелл, таких как пероксисомы и вакуоли, и других компонент секреторного пути регулируется белками, которые контролируют прохождение клеточного цикла. По-видимому, существуют пока малоизученные чекпойнты для наследования органелл, которые образуются *de novo*.

Автор приносит благодарность Н. И. Жучкиной за помощь в изготовлении рисунка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mills, K. D., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1997) *Cell*, **97**, 609–620.
2. Ritchie, K. B., Mallory, J. C., and Petes, T. D. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6065–6075.
3. Elledge, S. J. (1996) *Science*, **274**, 1664–1672.
4. Roos, W. P., and Kaina, B. (2006) *Trends Mol. Med.*, **12**, 440–450.
5. Колтовая, Н. А. (2009) *Генетика*, **45**, 5–21.
6. Demeter, J., Lee, S. E., Harber, J. E., and Stearns, T. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 487–492.
7. Колтовая, Н. А. (2013) *Генетика*, **49**, 797–813.
8. Garvik, B., Carson, M., and Hartwell, L. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6128–6138.
9. Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., et al. (1998) *Cell*, **94**, 399–409.
10. Giannattasio, M., Lazzaro, F., Longhese, M. P., et al. (2004) *EMBO J.*, **23**, 429–438.
11. Ivanov, E. L., Sugawara, N., White, C. I., et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3414–3425.
12. Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 260–268.
13. Putnam, C. D., Jaehning, E. J., and Kolodner, R. D. (2009) *DNA Repair (Amst.)*, **8**, 974–982.
14. Majka, J., Binz, S., Wold, M., and Burgers, P. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 27855–27861.
15. Paciotti, V., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 2046–2059.

16. Rouse, J., and Jackson, S. P. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 857–869.
17. Lee, J. H., and Paull, T. T. (2005) *Science*, **308**, 551–554.
18. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003) *Nature*, **421**, 499–506.
19. Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P. M. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 891–901.
20. Navadgi-Patil, V. M., and Burgers, P. M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 35853–35859.
21. Navadgi-Pati, V. M., and Burgers, P. M. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 743–753.
22. Puddu, F., Granata, M., Di Nola, L., et al. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 4782–4793.
23. Pfander, B., and Diffley, J. F. X. (2011) *EMBO J.*, **30**, 4897–4907.
24. Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., et al. (2004) *Nature*, **432**, 406–411.
25. Toh, G., O’Shaughnessy, A. M., Jimeno, S., et al. (2006) *DNA Repair (Amst.)*, **5**, 693–703.
26. Downs, J. A., Lowndes, N. F., and Jackson, S. P. (2000) *Nature*, **408**, 1001–1004.
27. Brush, G. S., and Kelly, T. J. (2000) *Nucleic. Acids Res.*, **28**, 3725–3732.
28. Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., et al. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1703–1711.
29. Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M., et al. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 675–679.
30. Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G., and Chen, J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19579–19582.
31. Conde, F., Refolio, E., Cordon-Preciado, V., et al. (2009) *Genetics*, **182**, 437–446.
32. Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., et al. (2006) *Cell*, **127**, 1361–1373.
33. Javaheri, A., Wysocki, R., Jobin-Robitaille, O., et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13771–13776.
34. Gilbert, C. S., Bosch, M. V., Green, C. M., et al. (2003) *EMBO Rep.*, **4**, 953–958.
35. Gilbert, C. S., Green, C. M., and Lowndes, N. F. (2001) *Mol. Cell*, **8**, 129–136.
36. Pellicoli, A., and Foiani, M. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, R769–771.
37. Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., and Stem, D. F. (1998) *Science*, **281**, 272–274.
38. Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., et al. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 1055–1065.
39. Sweeney, F. D., Yang, F., Chi, A., et al. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1364–1375.
40. Usui, T., Foster, S. S., and Petrini, J. H. (2009) *Mol. Cell*, **33**, 147–159.
41. Ubersax, J. A., and Ferrell, J. E. Jr. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **8**, 530–541.
42. Leroy, C., Lee, S. E., Vaze, M. B., et al. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 827–835.
43. Gunjan, A., and Verreault, A. (2003) *Cell*, **115**, 537–549.
44. Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., et al. (1996) *Science*, **271**, 357–360.
45. Paciotti, V., Clerici, M., Scotti, M., et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3913–3925.
46. Mordes, D. A., and Cortez, D. (2008) *Cell Cycle*, **7**, 2809–2812.
47. Giannattasio, M., Sommariva, E., Vercillo, R., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12997–13002.

48. Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2007) *EMBO J.*, **8**, 380–387.
49. Baldo, V., Testoni, V., Lucchini, G., and Longhese, M. (2008) *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 358–375.
50. Nakada, D., Shimomura, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1715–1724.
51. Van den Bosch, M., and Lowndes, N.F. (2004) *Cell Cycle*, **3**, 119–122.
52. Toh, G.W., and Lowndes, N.F. (2003) *Biochem. Soc. Transact.*, **31**, 242–246.
53. Smolka, M., Albuquerque, C., Chan, S.H., et al. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1358–1369.
54. Tourrière, H., and Pasero, P. (2007) *DNA Repair (Amst.)*, **6**, 900–913.
55. Cobb, J.A., Bjergbaek, L., and Gasser, S.M. (2002) *FEBS Lett.*, **529**, 43–48.
56. Frei, C., and Gasser, S.M. (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 2641–2646.
57. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., et al. (2002) *Nature*, **419**, 135–141.
58. Bando, M., Katou, Y., Komata, M., et al. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34355–34365.
59. Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A., et al. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 358–366.
60. Alcasabas, A.A., Osborn, A.J., Bachant, J., et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 958–965.
61. Osborn, A.J., and Elledge, S.J. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1755–1767.
62. Mohanty, B., Bairwa, N., and Bastia, D. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 879–902.
63. Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., et al. (2003) *Nature*, **424**, 1078–1083.
64. Wang, H., and Elledge, S.J. (2002) *Genetics*, **160**, 1295–1304.
65. Puddu, F., Piergiovanni, G., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2011) *PLoS Genet.*, **7**, e1002022.
66. Lou, H., Komata, M., Katou, Y., et al. (2008) *Mol. Cell*, **32**, 106–117.
67. Gottifredi, V., and Prives, C. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **16**, 355–368.
68. De Antoni, A., and Gallwitz, D. (2000) *Gene*, **246**, 179–185.
69. Hori, Y., Shirahige, K., Obuse, C., et al. (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 409–418.
70. Berens, T.J., and Toczyski, D.P. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1058–1067.
71. Komata, M., Bando, M., Araki, H., Shirahige, K. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5008–5019.
72. Cotta-Ramusino, C., Fachinetti, D., Lucca, C., et al. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 153–159.
73. Redon, C., Pilch, D.R., and Bonner, W.M. (2006) *Genetics*, **172**, 67–76.
74. Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., et al. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 991–1002.
75. Marini, F., Pelliccioli, A., Paciotti, V., et al. (1997) *EMBO J.*, **16**, 639–650.
76. Dotiwala, F., Haase, J., Arbel-Eden, A., et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11358–11363.
77. Королев, В.Г. (2007) *Радиац. Биол. Радиоэкол.*, **47**, 389–401.



78. Lisby, M., Rothstein, R., and Mortensen, U. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8276–8282.
79. Antunez de Mayolo, A., Lisby, M., Erdeniz, N. et al. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2587–2597.
80. Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quanh, P. N., et al. (2003) *Nature*, **425**, 859–864.
81. Din, S., Brill, S. J., Fairman, M. P., and Stillman, B. (1990) *Genes Dev.*, **4**, 968–977.
82. Kim, H. S., and Brill, S. J. (2003) *DNA repair (Amst.)*, **2**, 1321–1335.
83. Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., et al. (2004) *Nature*, **431**, 1011–1017.
84. Pelliccioli, A., Lee, S. E., Lucca, C., et al. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 293–300.
85. Clerici, M., Baldo, V., Mantiero, D., et al. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10126–10144.
86. Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., et al. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 37–45.
87. Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A. A., et al. (2008) *Nature*, **455**, 689–692.
88. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 10171–10176.
89. Melo, J. A., Cohen, J., and Toczyski, D. P. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 2809–2821.
90. Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., et al. (2001) *Science*, **294**, 867–870.
91. Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S. J. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 198–208.
92. Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C., and Rothstein, R. (2004) *Cell*, **118**, 699–713.
93. Bonilla, C. Y., Melo, J. A., and Toczyski, D. P. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 267–276.
94. Barlow, J. H., Lisby, M., and Rothstein, R. (2008) *Mol. Cell*, **30**, 73–85.
95. Колтговая, Н., Никулушкина, Ю., Кадышевская, Е., и др. (2008) *Генетика*, **44**, 1045–1055.
96. Moses, A. M., Heriche, J. K., and Durbin, R. (2007) *Genome Biol.*, **8**, R23.
97. Albuquerque, C., Smolka, M., Payne, S., et al. (2008) *Mol. Cell Proteomics*, **7**, 1389–1396.
98. Holt, I. J., Tuch, B. B., Johnson, A. D., et al. (2009) *Science*, **325**, 1682–1686.
99. Emili, A. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 183–189.
100. Caspari, T., Murray, J. M., and Carr, A. M. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 1195–1208.
101. Du, L. L., Nakamura, T. M., and Russell, P. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1583–1596.
102. Esashi, F., and Yanagida, M. (1999) *Mol. Cell*, **4**, 167–174.
103. Pfander, B., and Diffley, J. F. (2011) *EMBO J.*, **30**, 4897–4907.
104. Granata, M., Lazzaro, F., Novarina, D., et al. (2010) *PLoS Genet.*, **6**, e1001047.
105. Blankley, R. T., and Lydall, D. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 601–608.
106. Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., et al. (1999) *Science*, **286**, 1166–1171.
107. Gardner, R., Putman, C. W., and Weinert, T. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3173–3185.
108. O’Shaughnessy, A. M., Grenon, M., Gilbert, C. et al. (2006) *Methods Enzymol.*, **409**, 131–150.

109. Vialard, J., Gilbert, C., Green, C., and Lowndes, N. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5679–5688.
110. Grenon, M., Gilbert, C., and Lowndes, N.F. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 844–847.
111. Greenon, M., Costelloe, T., Jimeno, S., et al. (2007) *Yeast*, **24**, 105–119.
112. Smits, V. A. (2006) *Cell Cycle*, **5**, 1039–1043.
113. Goto, H., Kariya, R., Shimamoto, M., et al. (2012) *Cancer Sci.*, **103**, 775–781.
114. Tapia-Alveal, C., Calonge, T. M., and O’Connell, M. J. (2009) *Cell Div.*, **4**, 8.
115. Abreu, C. M., Kumar, R., Hamilton, D., et al. (2013) *PLOS Genet.*, **9**(4), e1003310.
116. Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J., and Jackson, S. (2007) *EMBO J.*, **8**, 851–857.
117. Wysocki, R., Javaheri, A., Allard, S., et al. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 8430–8443.
118. Chen, Y., Caldwell, J. M., Pereira, E., et al. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 182–190.
119. Gurley, L., Valdez, J. G., and Buchanan, J. S. (1995) *J. Biol. Chem.*, **290**, 27653–27660.
120. Swaney, D., Beltrao, P., Starita, L., et al. (2013) *Nat. Methods*, **10**, doi:10.1038/nmeth.2519.
121. Alexandrow, M. G., and Hamlin, J. L. (2005) *J. Cell Biol.*, **168**, 875–886.
122. Yu, Q., Kuzmiak, H., Zou, Y., et al. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 740–750.
123. Downs, J., Kosmidou, E., Morgan, A., Jackson, S.P. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 1685–1692.
124. Georgieva, M., Roguev, A., Balashev, K., et al. (2012) *Biochem. Biophys. Acta*, **1819**, 366–374.
125. Georgieva, M., Staneva, D., Uzunova, K., et al. (2015) *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, **59**, 182–192.
126. Neves-Costa, A., Will, W.R., Vetter, A. T., et al. (2009) *PLoS One*, **4**, e8111.
127. Awad, S., Ryan, D., Prochasson, P., et al. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 9477–9484.
128. Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C., et al. (2001) *Science*, **293**, 1142–1146.
129. Clements, A., Poux, A. N., Lo, W. S., et al. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 461–473.
130. Koltovaya, N., Guerasimova, A. S., Tchekhouata, I. A., et al. (2003) *Yeast*, **20**, 955–971.
131. John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., et al. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1196–1208.
132. Кадьшевская, Е. Ю., Колтовая, Н. А. (2009) *Генетика*, **45**, 458–470.
133. Li, X., and Cai, M. (1997) *Mol. Cell Biol.*, **17**, 2723–2734.
134. Sidorova, J. M., and Breeden, L. L. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 3032–3045.
135. Sidorova, J. M., and Breeden, L. L. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 3405–3416.
136. Холмуродов, Х. Т., Колтовая, Н. А. (2009) *Биофизика*, **54**, 999–1004.
137. Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., et al. (1994) *Genes Dev.*, **8**, 2401–2415.
138. Enserink, J., Hombaur, H., Huang, M., and Kolodner, R. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 423–437.
139. Sorger, P. K., and Murray, A. W. (1992) *Nature*, **355**, 365–368.

140. Kitazono, A. A., and Kron, S. J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 48627–48634.
141. Santocanale, C., Diffley, J. F. X. (1998) *Nature*, **395**, 615–618.
142. Zegerman, P., and Diffley, J. F. (2009) *DNA Repair (Amst.)*, **8**, 1077–1088.
143. Cheng, L., Collyer, T., and Hardy, C. F. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4270–4278.
144. Dohrmann, P., Oshiro, G., Tecklenburg, M., and Sclafani, R. (1999) *Genetics*, **151**, 965–977.
145. Pasero, P., Duncker, B., Schwob, E., and Gasser, S. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 2159–2176.
146. Weinreich, M., and Stillman, B. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5334–5346.
147. Vodenicharov, M. D., and Weillinger, R. J. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 127–137.
148. Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., et al. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 193–206.
149. Surovtseva, Y. V., Churikov, D., Boltz, K. A., et al. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 207–218.
150. Gao, H., Cervantes, R., Mandell, E., et al. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 208–214.
151. Frank-Vaillant, M., and Marcand, S. (2002) *Mol. Cell*, **10**, 1189–1199.
152. Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004) *EMBO J.*, **23**, 4868–4875.
153. Dewar, J. M., and Lydall, D. (2012) *Chromosoma*, **121**, 117–130.
154. Jia, X., Weinert, T., and Lydall, D. (2004) *Genetics*, **166**, 753–764.
155. Lydall, D., and Weinert, T. (1995) *Science*, **270**, 1488–1491.
156. Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1957–1962.
157. Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J. H. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 1255–1266.
158. Palou, G., Palou, R., Guerra-Moreno, A., et al. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 26431–26440.
159. Geymonat, M., Spamos, A., Wells, G. P., et al. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 2277–2285.
160. Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., et al. (2004) *Cell*, **117**, 899–913.
161. De Bruin, R., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., et al. (2004) *Cell*, **117**, 887–898.
162. De Bruin, R. A., Kalashnikova, T. I., Chahwan, C., et al. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 483–496.
163. De Bruin, R. A., and Wittenberg, C. (2009) *Cell Cycle*, **8**, 214–217.
164. Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S. J. (1998) *Cell*, **94**, 595–605.
165. Fu, Y., Pastushok, L., and Xiao, W. (2008) *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 908–926.
166. Elledge, S. J., Zhou, Z., Allen, J. B., and Navas, T. A. (1993) *Bioessay*, **15**, 333–339.
167. Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., et al. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3544–3553.
168. Lee, Y. D., and Elledge, S. J. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 334–344.
169. Liberi, G., Chiolo, I., Pelliccioli, A., et al. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5027–5038.
170. Zierhut, C., and Diffley, J. F. (2008) *EMBO J.*, **27**, 1875–1885.

171. Sanchez, Y., Bachant, J., Price, C., et al. (1999) *Science*, **286**, 1166–1171.
172. Agarwal, R., and Cohen-Fix, O. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 1371–1382.
173. Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., and Cohen-Fix, O. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 45027–45033.
174. Hsu, W. S., Erickson, S.L., Tsai, H. J., et al. (2011) *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 2470–2483.
175. Sandell, L.L, and Zakian, V. A. (1993) *Cell*, **75**, 729–739.
176. Toczyski, D. P., Galgoczy, D.J., and Hartwell, L. H. (1997) *Cell*, **90**, 1097–1106.
177. Lee, S., Pelliccioli, A., Demeter, J., et al. (2000) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **65**, 303–314.
178. O’Neill, B., Szyjka, S., Lis, E., et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9290–9295.
179. Cheng, L., Hunke, L., and Hardy, C. F. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 360–370.
180. Schleker, T., Shimada, K., Sack, R., et al. (2010) *Cell Cycle*, **9**, 350–363.
181. Diani, L., Colombelli, C., Nachimuthu, B., et al. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 32627–32634.
182. Shimada, K., Pasero, P., and Gasser, S.M. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 3236–3252.
183. Tercero, J.A., Longhese, M.P., and Diffley, J.F. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 1323–1336.
184. McCusker, D., and Kellogg, D.R. (2012) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **24**, 845–851.
185. Barbet, N. C., and Carr, A. M. (1993) *Nature*, **364**, 824–827.
186. Rowley, R., Hudson, J., and Young, P. G. (1992) *Nature*, **356**, 353–355.
187. Amon, A., Surana, U., Muroff, I., and Nasmyth, K. (1992) *Nature*, **355**, 368–371.
188. Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 176–187.
189. Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M., and Snyder, M. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 841–851.
190. Bashirullah, A., Cooperstock, R., and Lipshitz, H. (1998) *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 335–394.
191. Takizawa, P., DeRisi, J.L., Withelm, J.E., and Vale, R.D. (2000) *Science*, **20**, 341–344.
192. Longtine, M., Theesfeld, C.L., McMillan, J.N., et al. (2000) *Mol. Cell*, **20**, 4049–4061.
193. Cid, V., Shulewitz, M., McDonald, K., and Thorner, J. (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1645–1669.
194. Longtine, M. S., Fares, H., and Pringle, J. R. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 719–736.
195. McMillan, J., Longtine, M. S., Sia, R. A., et al. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6929–6939.
196. Shulewitz, M.J., Inouye, C.J., and Thorner, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7123–7137.

197. Hanrahm, J., and Snyder, M. (2003) *Mol. Cell*, **12**, 663–673.
198. Okizaki, D., and Nojima, H. (2001) *FEBS Lett.*, **489**, 197–201.
199. Lew, D. J., and Burke, D. J. (2003) *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 251–282.
200. Chen, Y., and Sanchez, Y. (2004) *DNA Repair (Amst.)*, **3**, 1025–1032.
201. Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., et al. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 861–871.
202. De Bettignies, G., and Johnston, L. H. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, R301.
203. Smeets, M. F., and Segal, M. (2002) *Cell Cycle*, **1**, 308–311.
204. Jensen, S., Segal, M., Clarke, D. J., and Reed, S. I. (2001) *J. Cell Biol.*, **152**, 27–40.
205. Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhimann, F. (2006) *Cell*, **125**, 719–732.
206. Sogo, L. F., and Yaffe, M. P. (1994) *J. Cell Biol.*, **126**, 1361–1373.
207. Garcia-Rodriguez, L., Crider, D., Gay, A., et al. (2009) *Curr. Biol.*, **19**, 1730–1735.
208. Song, S., Grenfell, T. Z., Garfield, S., et al. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 286–298.
209. Xu, S., Huang, H. K., Kaiser, P., et al. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 329–332.
210. Yoshida, S., and Toh-e, A. (2001) *Genes Genet. Syst.*, **76**, 141–147.
211. Bembenek, J., Kang, J., Kurischko, C., et al. (2005) *Cell Cycle*, **4**, 961–971.
212. Jimenez, J., Cid, V. J., Cenamor, R., et al. (1998) *J. Cell Biol.*, **143**, 1617–1634.
213. Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., et al. (1999) *Cell*, **97**, 233–244.
214. Lippincott, J., Shannon, K. B., Shou, W., et al. (2001) *J. Cell Sci.*, **114**, 1379–1386.
215. Hwa Lim, H., Yeong, F. M., and Surana, U. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4734–4743.
216. Blondel, M., Bach, S., Bamps, S., et al. (2005) *EMBO J.*, **24**, 1440–1452.
217. Meitinger, F., Petrova, B., Lombardi, I. M., et al. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 1851–1861.
218. Nishihama, R., Schreiter, J. H., Onishi, M., et al. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 995–1012.
219. Lai, C. Y., Jaruga, E., Borghouts, C., and Jazwinski, S. M. (2002) *Genetics*, **162**, 73–87.
220. Crider, D., Garcia-Rodrigues, L., Srivastava, P., et al. (2012) *J. Cell Biol.*, **198**, 793–798.
221. Tayloer, S. D., Zhang, J. S., Eaton, M. S., et al. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 3010–3018.
222. Lebedeva, M. A., and Shadel, G. S. (2007) *Cell Cycle*, **6**, 2048–2057.
223. Reinhard, H. C., and Yaffe, M. B. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 245–255.
224. Eaton, J. S., Lin, Z. P., Sartorelli, A. C., et al. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 2723–2734.
225. Bochman, M., Sabouri, N., and Zakian, V. A. (2010) *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 237–249.
226. Makovets, S., and Blackburn, E. H. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1383–1386.
227. Meeusen, S., and Nunnari, J. (2003) *J. Cell Biol.*, **163**, 503–510.
228. Chen, X., Guan, M., and Clark-Walker, G. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3473–3477.

229. Mbantenkhu, M., Wang, X., Nardoizzi, J., et al. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 42360–42370.
230. Pan, X., Ye, P., Yuan, D.S., et al. (2006) *Cell*, **124**, 1069–1081.
231. Колговая, Н., Карвига, Т.Д., Любимова, К.А., и др. (1998) *Генетика*, **34**, 610–624.
232. Loewen, C., Young, B., Tavassoli, S., and Levine, T. (2007) *J. Cell. Biol.*, **179**, 467–483.
233. Keaton, M. A., and Lew, D.J. (2006) *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**, 540–546.
234. Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010) *Cell*, **142**, 256–269.
235. Wittenberg, C., Richardson, S.L., and Reed, S.I. (1987) *J. Cell Biol.*, **105**, 1527–1538.
236. Verges, E., Colomina, N., Gari, E., et al. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 649–662.
237. Du, Y., Ferro-Novick, S., and Novick, P. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 2871–2878.
238. Drubin, D.G., Jones, H.D., and Wertman, K.F. (1993) *Mol. Biol. Cell*, **4**, 1277–1294.
239. Prinz, W. A., Grzyb, M., Veenhuis, J. A., et al. (2000) *J. Cell Biol.*, **150**, 461–474.
240. Park, H., Bi, E., Pringle, J.R., et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4463–4468.
241. Han, B.K., Bogomolnaya, L.M., Totte, J.M., et al. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2606–2616.

Получено 15 октября 2015 г.

Редактор *Е. В. Григорьева*

Подписано в печать 23.12.2015.

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

Усл. печ. л. 2,43. Уч.-изд. л. 2,93. Тираж 205 экз. Заказ № 58719.

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

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)