

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

29-01

P19-2001-29

Н.А.Колтовая

МЕХАНИЗМ СЧЕКПОИТ-КОНТРОЛЯ
У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Лекция, прочитанная на XXXIV зимней школе ПИЯФ
по молекулярной биологии, Санкт-Петербург, Репино,
28 февраля – 4 марта 2000 г.

2001

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных функций живой клетки является поддержание целостности генома. Однако в клетке постоянно возникают повреждения ДНК как в результате внешних воздействий, так и как следствие нормального функционирования клеточных процессов, например таких, как репликация ДНК. Клетка использует различные стратегии для поддержания целостности генома. Наиболее важной является репарация. Многочисленные репарационные системы удаляют потенциально мутагенные повреждения ДНК. Однако реакция клетки на повреждения гораздо сложнее и включает замедление прохождения клеточного цикла и активацию синтеза специфических белков. Эти процессы, по-видимому, увеличивают возможности репарации. Во-первых, активируется транскрипция некоторых репарационных ферментов. Во-вторых, остановка клеточного цикла обеспечивает клетке дополнительное время для репарации повреждений ДНК. Таким образом, эти процессы предотвращают репликацию и расхождение поврежденных хромосом.

Механизмы контроля деления и репарации обнаружены как у прокариот, так называемый SOS-ответ, так и у эукариот. Одно- и двунитевые разрывы ДНК активируют белок RecA, который стимулирует расщепление белка LexA, ингибитора генной транскрипции. Расщепление LexA обеспечивает остановку клеточного деления и активацию регулона, содержащего около 20 генов эксцизионной репарации, рекомбинации и мутагенеза. Ген RecA необходим как для индукции транскрипции, так и для остановки клеточного цикла, которые в данном случае механически связаны.

В настоящее время не известно, существует ли в эукариотической клетке аналогичная общая система, контролирующая оба эти процесса. Механизмы, лежащие в основе остановки и индукции транскрипции в результате повреждения ДНК у эукариот, недостаточно хорошо изучены. Задержка клеточного цикла известна давно и у клеток млекопитающих, и у дрожжей. Однако генетическую детерминированность этой задержки, названную *checkpoint*-контролем, впервые продемонстрировали на дрожжах Вейнерт и Хартвелл в 1988 году. Предполагают, что продукты *checkpoint*-генов сканируют целостность ДНК и обеспечивают задержку клеточного деления в случае обнаружения повреждения. В результате ареста клетка имеет дополнительное время для репарации повреждений ДНК. Если клетка утрачивает способность останавливаться, она вступает в митоз с нерепарированной молекулой ДНК, что ведет к быстрой гибели клетки. Таким образом, нарушения *checkpoint*-контроля приводят к снижению генетической стабильности и повышению чувствительности к ДНК-тропным агентам. Ферменты могут активировать репарационную систему или апоптоз, запрограммированную смерть для удаления сильно поврежденных клеток.

Для млекопитающих способность распознавать и отвечать на повреждения ДНК критична, если учесть продолжительность жизни организма. Показано, что дефекты *checkpoint*-контроля играют важную роль в канцерогенезе. Мутации в

таких генах, как p53 и ATM, приводят к предрасположенности к раку из-за увеличения нестабильности и мутагенеза. Заинтересованность в изучении механизмов *checkpoint*-регуляции также обусловлена возможностью нарушения этого механизма при других заболеваниях человека (пигментная ксеродерма, Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), анемия Фанкони, кокаиновый синдром, синдром Блума, синдром Вернера и рак молочной железы (BRCA)).

Имеющиеся данные показывают, что основные механизмы, контролирующие ответ клетки на повреждения ДНК, консервативны у всех эукариот. Исследования на простейших моделях, таких как эволюционно удаленные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, позволяют идентифицировать многочисленные *checkpoint*-белки, большинство из которых имеют структурные и функциональные эквиваленты у человека (табл. 1), и, таким образом, обеспечивают важный вклад в понимание биохимических основ *checkpoint*-контроля у всех эукариот.

Таблица 1. *Checkpoint*-гены, контролирующие повреждения ДНК, эволюционно консервативны

Функция	Гены <i>S. cerevisiae</i>	Гены <i>S. pombe</i>	Гены человека
Протеинкиназа	MEC1 RAD9 MEC3	rad3 rhp9/crb2	ATM, ATR
Нуклеаза	DDC1 RAD17	rad9 rad1	HRAD9 HRAD1
RFC-подобный	RAD24	rad17	HRAD17
Протеинкиназа	RAD53	cds1	
ДНК-полимераза ε	POL2 DPB11	cdc20 cut5	POL ε
Репликативный фактор C	RFC5		HRFC38
Репликативный фактор A	RFA1	rad11	HRFA1
ДНК-праймаза	PRI1 PDS1	cut2	PRIM1
Протеинкиназа	DUN1		
Транскрипционный фактор			p53
Ингибитор киназы			p21

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДРОЖЖЕЙ

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* - одноклеточные эукариоты, размножаются вегетативно, почкованием. Жизненный цикл включает цикл деления гаплоидной (одинарный набор хромосом) или диплоидной (двойной набор хромосом) клетки

(рис.1). В клетках идентифицирована контрольная точка *START*, запускающая цикл митотического деления. Для прохождения *START* необходимо достижение клеткой критических размеров. Критические размеры варьируют в зависимости от скорости размножения и возраста клеток. Прохождением контрольной стадии клеточного цикла уничтожается неопределенность в дальнейшей судьбе дрожжевой клетки. Так, например, гаплоидная клетка, находящаяся в ранней стадии фазы *G1* (до контрольной точки), может пойти по одному из трех жизненных путей в зависимости от внешних условий. Клетка, прошедшая контрольную стадию, не будет ни конъюгировать, ни переходить в покоящееся состояние, пока она не завершит начатый митотический цикл.

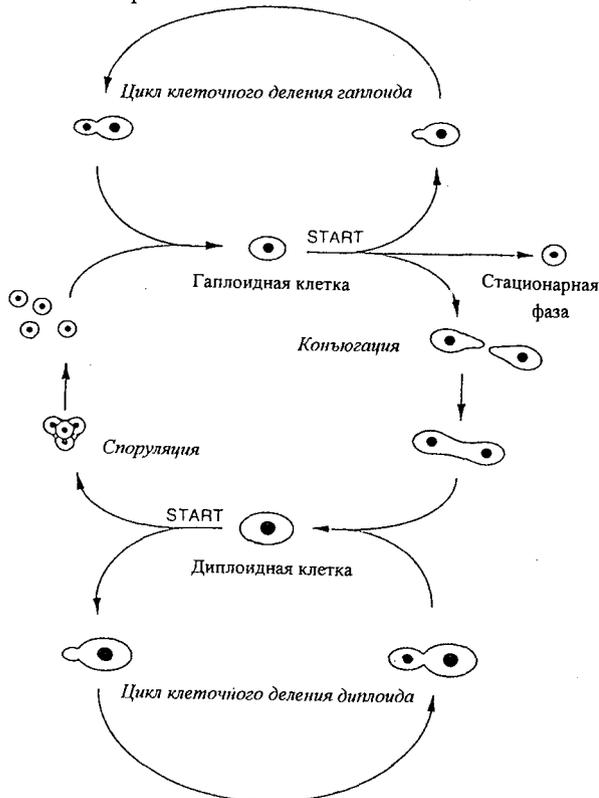


Рис.1. Жизненный цикл дрожжей-сахаромицетов *Saccharomyces cerevisiae*

При наличии необходимых питательных веществ клетка завершает начатый митотический цикл (рис. 1). Морфологическим сигналом, свидетельствующим о прохождении *START* и начале синтеза ДНК, может служить появление почки. При истощении питательных веществ клетка не достигает минимального размера, необходимого для прохождения *START*, и вступает в стационарную фазу. В присутствии соответствующего фактора скрещивания клетка проходит *START* и

конъюгирует с клеткой противоположного типа спаривания. Образующаяся диплоидная клетка проходит деление. При истощении в среде питательных веществ клетка не способна пройти *START*, происходит споруляция: ядро вегетативной клетки претерпевает мейоз, клетка превращается в аск с четырьмя гаплоидными спорами. При прорастании споры попарно копулируют, образуя диплоидные зиготы. Будучи изолированными поодиночке, споры прорастают и при этом могут давать клоны устойчиво гаплоидных клеток.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ ДРОЖЖЕЙ

В дальнейшем будем рассматривать только митотический цикл деления гаплоидной клетки. Прохождение через клеточный цикл приводит к удвоению клетки. Это требует полного и безошибочного копирования всего генома, а также аккуратной сегрегации сестринских хроматид в дочерние клетки.

Традиционно клеточный цикл состоит из четырех фаз. Репликация ДНК осуществляется в *S*-фазе, а сегрегация хромосом в *M*-фазе. *S*- и *M*-фазы разделяются так называемыми промежуточными фазами *G1* (до репликации) и *G2* (до митоза). Кроме того, цикл деления эукариотических клеток можно подразделить на интерфазу и фазу деления. Интерфаза состоит из фаз *G1*, *S* и *G2*, занимает обычно не менее 90% времени всего клеточного цикла. Фаза деления состоит из фазы *M*. Фаза *M*, в свою очередь, состоит из двух последовательных стадий - деления ядра (митоз) и деления цитоплазмы (цитокинез).

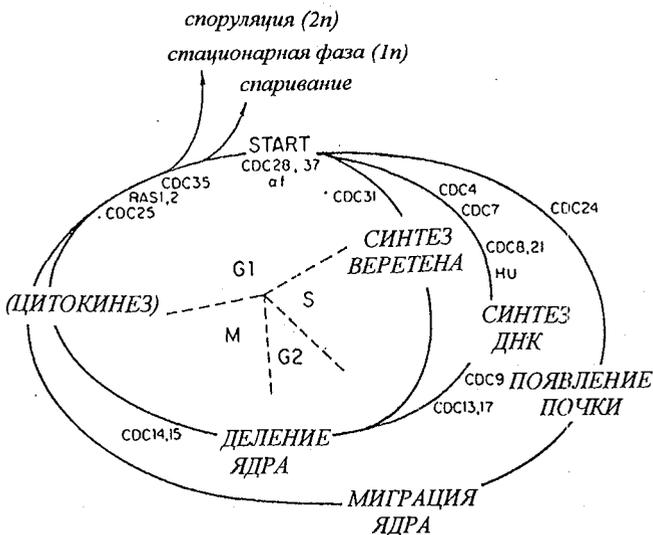


Рис. 2. Основные события, протекающие в процессе клеточного цикла деления. Указаны гены CDC, контролирующие различные стадии цикла

У почкующихся дрожжей инициация репликации, дупликация веретена и образование почки осуществляются примерно в одно время, сразу же после того, как клетка пройдет *START* (рис.2). У дрожжей, в отличие от большинства других эукариотических клеток, в митозе не происходит разрушения ядерной мембраны. У почкующихся дрожжей фаза *G2*, по существу, отсутствует и пострепликативную часть цикла занимает в основном растянутый митоз. Еще в фазе *S* образуется короткое веретено, а клетка при этом имеет уже довольно крупную почку. Ядро затем мигрирует в шейку почки, а веретено удлиняется. По завершении митоза почка, получившая одно из сестринских ядер, отделяется от материнской клетки. Видимой конденсации хромосом в митозе у *Saccharomyces cerevisiae* не происходит.

Таким образом, прохождение индивидуальными клетками клеточного цикла может отслеживаться по морфологии клетки и ядра. Появление почки соответствует времени синтеза ДНК. Последующие стадии *G2* и митоз различаются морфологией ядра: клетки в *G2* и до ядерной сегрегации вплоть до анафазы имеют ядро в области перетяжки образующейся почки, в то время как клетки, проходящие митоз, имеют удлиненное биполярное ядро. В процессе цитокинеза образуются две *G1*-клетки без почек.

ЦИКЛИНОВЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

Переход между фазами клеточного цикла осуществляют протеинкиназы, так называемые циклинзависимые киназы CDK (*cyclin-dependent protein kinase*). Прохождение клеточного цикла в эукариотической клетке регулируется активацией и инактивацией циклинзависимых киназ. Активность CDK зависит от ассоциации киназы с различными членами семейства регуляторных субъединиц, называемых циклинами (рис.3). Циклины экспрессируются в определенные моменты клеточного цикла. Циклины не только активируют киназы, но и определяют их субстратную специфичность. В зависимости от циклинового партнера и, следовательно, стадии клеточного цикла, в которой этот циклин экспрессируется, фосфорилируются различные (в основном пока неизвестные) молекулы-мишени и, таким образом, активируются или инактивируются в определенное время. Сами CDK также являются объектами фосфорилирования.

У *S. c.* идентифицировано более 30 протеинкиназ (ПК). В зависимости от того, какая аминокислота фосфорилируется ПК, существуют серин/треониновые и тирозиновые ПК. У дрожжей обнаружены только серин/треониновые ПК.

Каталитическая субъединица CDK имеет домен вблизи аминоконца, известный как мотив *PSTAIRE*. Кристаллическая структура человеческой протеинкиназы *Cdc2* хорошо изучена, и она служит моделью для других CDK, в том числе и дрожжевой *Cdk/Cdc28*. Структура каталитического кода *Cdc2* имеет 2 центра: в N-конце в основном β -лист и в C-конце α -спираль. АТФ связывается в щели между этими двумя центрами. Сама каталитическая субъединица имеет

слабую, если вообще имеет, активность. Сравнение структуры мономера Cdk2 со структурами протеинкиназ, активных в мономерной форме, таких как

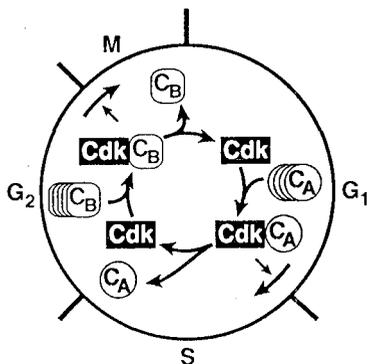


Рис. 3. Схема активации циклинами циклинзависимой киназы на разных стадиях клеточного цикла

циклическая АМР (сАМР), показало, что *Cdc2* утратила активность мономера в результате смещения N-конца по отношению к С-концевому центру, вызывая ошибочное выстраивание ключевых каталитических остатков, участвующих в передаче Р, и нарушая сайт связывания с субстратом "Т-петлей". Для активации необходимо фосфорилирование Т169 в Т-петле, что приводит к дополнительному движению Т-петли, открывающему область связывания с белковым субстратом и увеличивающему число контактов между *Cdk* и циклином. Т-петля является сайтом автофосфорилирования для многих ПК, но не для CDK. Для фосфорилирования этой позиции необходима CDK-активирующая киназа САК (*CDK-activating kinase*).

Циклины обычно определяются по их способности связывать и активировать CDK, но часто узнаются по нуклеотидной последовательности – по наличию консервативного домена "*cyclin box*", состоящего из 5 α-спиралей. Прямые контакты существуют между доменом "*cyclin box*" и мотивом *PSTAIRE* и Т-петлей у *Cdk2*. Каталитические остатки и Т-петля *Cdk2* подвергаются сильным конформационным изменениям. Эти изменения ответственны за увеличение активности в 40 000 раз.

CDK фосфорилируют серин или треонин в *S/T-P*-мотиве. Полная активация CDK обычно требует двух событий - связывания с циклинами и фосфорилирования (Т169 у *Cdc28*). Подавление активности происходит при связывании с ингибиторными белками (СКИ) и событиями ингибирующего фосфорилирования (Y19, Т18 *Cdc28*). Регуляторы активности CDK находятся под трансляционным, транскрипционным и протеолитическим (обычно юбиквитинзависимым) контролем. В противоположность им каталитическая субъединица CDK обычно стабильна и находится в клетке в избытке.

ПРОТЕИНКИНАЗА Cdc28

У *S. c.* идентифицировано пять CDK - *Cdc28*, *Pho85*, *Kin28*, *Ssn3* и *Ctk1* (табл. 2). Наиболее изученная киназа *Cdc28* является центральным координатором множества событий клеточного цикла. Этот ген кодирует высококонсервативный белок весом 34 kDa, обладающий серин/треониновой протеинкиназной активностью. Он обнаружен у всех организмов. Киназа *Cdc28* необходима для прохождения *START*, а также является активным компонентом MPF (*M-phase promoting factor*), контролирующего переход из *G2* в *M*-фазу.

Как уже говорилось ранее, в поздней стадии фазы *G1* есть точка *START*. Если условия позволяют, то клетка инициирует синтез ДНК и завершает клеточный цикл. Генетический анализ показал, что для прохождения *START* необходим продукт гена *CDC28*. Таким образом, ПК *Cdc28* нужна для прохождения точки *START* и для инициации синтеза ДНК. Однако у дрожжей в поздней *G1* происходят и другие *START*-зависимые события, например дупликация телец веретена (аналог дупликаций центриоли у позвоночных) и рост клеточной стенки, ведущий к возникновению почки и совпадающий по времени с фазой *S*.

Активация циклинами

Активность киназы *Cdc28* зависит от ее фосфорилирования и ассоциации с циклинами, синтезирующимися в определенных фазах клеточного цикла (рис. 4). У *S. c.* для регуляции различных аспектов прохождения клеточного цикла киназа *Cdc28* взаимодействует с 9 различными циклиновыми субъединицами, включая 3 *G1*-циклина (*CLN*) и 4 митотических циклина, кодируемых генами *CLB1-4*. Наблюдается 3 волны синтеза циклинов: первая - в поздней *G1* синтезируются циклины, необходимые для *START* (*CLN1*, *CLN2*, *CLB5*, *CLB6*, *HCS26*); вторая - в *S/G2* синтезируются циклины, необходимые для митоза (*CLB 3*, *CLB4*), и третья - в *M* (*CLB 1*, *CLB2*).

Активация фосфорилированием

Аффинность связывания с циклином в дальнейшем стабилизируется и увеличивается фосфорилированием CDK. Полная активация большинства комплексов CDK-циклин требует фосфорилирования *Thr* в Т-петле в положении Т169 у *Cdc28*, что приводит к дополнительному движению Т-петли и открыванию сайтов связывания с субстратом, увеличивая число контактов между *Cdk* и циклином. Фосфорилирование Т169 у *Cdc28* осуществляет киназа *CAK1* (*CDK-activating kinase*). *Cak1* активна в виде мономера и не нуждается в циклинах для своей активности, не наблюдается периодичности или индуцибельности экспрессии. Нефосфорилируемый мутант *Cdc28*-Т169А не может активироваться *in vitro* или поддерживать клеточное деление *in vivo*.

Таблица 2. Функции протеинкиназ (CDK) у *Saccharomyces cerevisiae* и их циклиновые активаторы

CDK	Циклин	Функции или важные свойства	
<i>Cdc28</i>	<i>Cln1</i>	Опосредует глюкозный контроль размера клетки при почковании. Все функции, перечисленные для <i>Cln2</i> .	
	<i>Cln2</i>	Экспрессируется в точке START. Запускает митотический цикл деления. Стимулирует Sic1-деградацию. Иницирует локализованный рост, ведущий к почкованию. Иницирует SPB-дубликацию. Репрессирует феромон-индуцибельную транскрипцию.	
	<i>Cln3</i>	Экспрессируется в течение всего клеточного цикла. Стимулирует START-специфическую транскрипцию. Опосредует контроль размера клетки.	
	<i>Clb1</i>	Экспрессируется в G2/M. Минорный участник MPF. Наиболее важный циклин в мейозе II.	
	<i>Clb2</i>	Экспрессируется в G2/M. Основной участник MPF. Способствует элонгации веретена. Негативно регулирует возникновение почки. Способствует переключению деполяризованного роста почки. Репрессирует SBF-опосредованную транскрипцию.	
	<i>Clb3,</i> <i>Clb4</i>	Экспрессируется в середине S/G2. Важен для образования веретена. Может инициировать S в отсутствие <i>Clb5</i> или <i>Clb6</i> .	
	<i>Clb5</i>	Экспрессируется в START. Важен для инициации S. Может стимулировать SBF-регулируемую транскрипцию генов. Предотвращает реинициацию уже открытых ori-репликации. Возможно, имеет роль в образовании веретена. Может выполнять существенные функции <i>Cln</i> при сверхэкспрессии.	
	<i>Clb6</i>	Экспрессируется в START. Важен для инициации S. Репрессирует START-специфическую транскрипцию. Имеет важную роль в образовании веретена. Может выполнять существенные функции <i>Cln</i> при сверхэкспрессии.	
	<i>Pho85</i>	<i>Clg1,</i> <i>Pcl1,</i> <i>Pcl2,</i> <i>Pcl5,</i> <i>Pcl9</i>	Играет роль в START, возникновении почки и гиперполяризованном росте ($\Delta pcl1 \Delta pcl2 \Delta cln1 \Delta cln2$ летален и не способен давать почки; $\Delta cgl1 \Delta pcl1 \Delta pcl2 \Delta pcl5 \Delta pcl9$ имеют удлиненные почки и образуют цепочки из клеток).
		<i>Pho80</i>	Репрессор транскрипции кислой фосфатазы.
<i>Pcl6,</i> <i>Pcl7,</i> <i>Pcl8,</i> <i>Pcl10</i>		Функция неизвестна. Негативный регулятор гликоген синтетазы 2.	
<i>Kin28</i>		<i>Ccl1</i>	Фосфорилирует С-концевой повтор большой субъединицы РНК-полимеразы II. Компонент транскрипционного фактора TFIIN.
<i>Ssn3</i>		<i>Ssn8</i>	Фосфорилирует С-концевой повтор большой субъединицы РНК-полимеразы II. Компонент галофермента РНК-полимеразы II.
<i>Ctk1</i>		<i>Ctk2</i>	Фосфорилирует С-конц. повтор большой субъединицы РНК-полимеразы II.

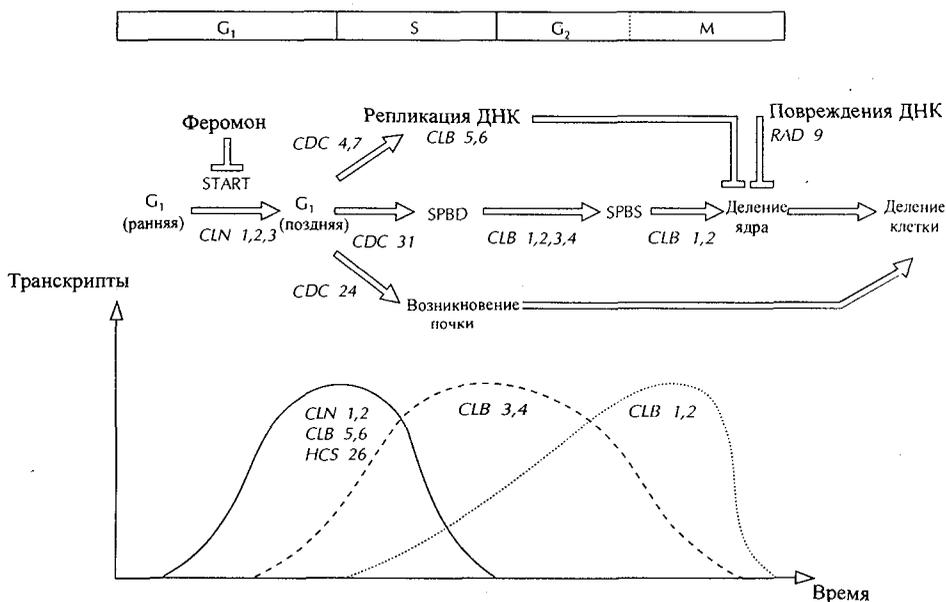


Рис. 4. Волнообразная активация различных циклинов запускает различные события на разных стадиях клеточного цикла

Мишени протеинкиназы p34

Активный комплекс *Cln-Cdc28* способен фосфорилировать какие-то субстраты. Очень мало известно о мишенях митотических форм *Cdc28*. Одной из них является транскрипционный фактор *Swi5*. Показано, что клеточная регуляция поступления *Swi5* в ядро зависит от фосфорилирования сайта вблизи сигнала ядерной локализации *Swi5*. *Swi5* накапливается в цитоплазме в процессе *G2*- и *M*-фазы и поступает в ядро только в фазе *G1*. Сигнал ядерной локализации *Swi5* фосфорилируется киназой *Cdc28*, что предотвращает поступление *Swi5* в ядро. Разрушение киназы в конце митоза ведет к дефосфорилированию и поступлению *Swi5* в ядро.

Регуляция перехода *G1/S*

Полагают, что накопление циклинов в поздней *G1* активирует *Cdc28*. Активация ПК в *START* требует ассоциации по крайней мере с одним из 3-х "G1-специфических циклинов", кодируемых генами *CLN1*, *CLN2* и *CLN3*. Ни

один из CLN не является жизненно важным, однако делетирование всех трех CLN летально и вызывает остановку клеток в состоянии непочкующихся *G1*-клеток.

Потенциальными субстратами *Cdc28* являются транскрипционные факторы, которые контролируют *G1*-специфическую экспрессию генов (рис.5). Эти гены можно разбить на 2 группы в соответствии с нуклеотидной последовательностью, используемой для регуляции.

1-я группа включает CLN1, CLN2, циклинподобный ген HCS26 и ген HO. Экспрессия генов управляется SCB-регуляторным элементом (*Swi4*, *Swi6* cell cycle box, consensus CACGAAA).

SBF (*SCB binding factor*) - транскрипционный фактор, ответственный за активацию SCB-последовательностей, содержит 2 белка *Swi4* и *Swi6*. Белок *Swi4* ответственен за специфическое узнавание SCB-последовательностей, имеет уникальный ДНК-связывающий домен в аминоконце. Белок *Swi6* связывается неспецифически с молекулами ДНК. Белки *Swi6* и *Swi4* связываются карбоксильными концами обоих белков. Белок *Swi6* имеет сайт для фосфорилирования киназой p34.

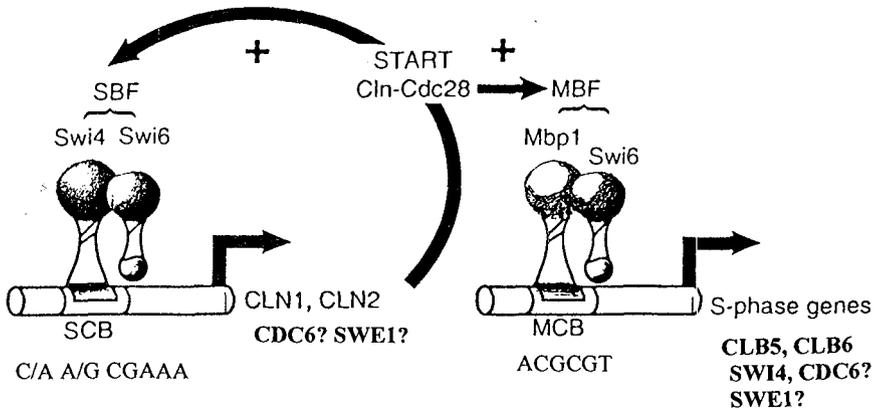


Рис. 5. Схема активации транскрипционных факторов протеинкиназой Cdc28

Swi4 и *Swi6* также необходимы для функционирования CLN3, хотя его транскрипция происходит постоянно на протяжении всего клеточного цикла.

Экспрессия *Swi4* и *Swi6* зависит от CDC28. В свою очередь, активность p34 зависит от активности CLN. Образуется петля положительной обратной связи (*positive feed-back loop*), когда низкий уровень активности p34 позволяет осуществлять некоторый уровень экспрессии SWI4 и SWI6, что ведет к увеличению синтеза CLN, а это повышает активность p34 и т. д. Такого сорта

Таблица 3. Гены *Saccharomyces cerevisiae*, регулируемые (или потенциально регулируемые) МСВ-элементами

Синтез dNTP

TMP1	тимидилат-синтетаза
CDC8	тимидилаткиназа
RNR1	рибонуклеотидредуктаза – регуляторная субъединица I

Полимеризация ДНК

POL1	ДНК-полимераза I
POL12	ДНК-полимераза I – β -субъединица
POB1	(CTF4 или CHL15) ДНК-полимераза I – связывающий белок
POL2	ДНК-полимераза II
DPB2	ДНК-полимераза II - субъединица
DPB3	ДНК-полимераза II - субъединица
POL3	ДНК-полимераза III
POL10	PCNA
PRJ1	ДНК-праймаза – 48-kDa субъединица
PRJ2	ДНК-праймаза – 58-kDa субъединица

Другие репликативные гены

CDC9	ДНК-лигаза
TOP2	ДНК-топоизомераза II
RFA1	репликативный фактор A – 69-kDa субъединица
RFA2	репликативный фактор A – 36-kDa субъединица
RFA3	репликативный фактор A - 13
CDC6	функция неизвестна
DBF4	функция неизвестна
DNA43	функция неизвестна

Репарация ДНК

UNG1	урацил-ДНК-гликозилаза
RAD5	эксцизионная репарация
RAD51	рекомбинационная репарация ДНК
RAD54	рекомбинационная репарация ДНК

Циклины

CLN1	G1-циклин
CLN2	G1-циклин
HCS26	G1-циклин
CLB5	циклин В-типа

Ядерные компоненты

NUF1	белок ядерного скелета
NUPI16	белок - компонент ядерных пор

Гены других видов дрожжей

rad3	репарация ДНК – <i>S. pombe</i>
cdc22 ⁺	рибонуклеотидредуктаза – регуляторная субъединица, <i>S. pombe</i>
POL1	ДНК-полимераза I – <i>S. pombe</i>
TOP2	ДНК-полимераза II – <i>S. pombe</i>
	тимидилат-синтетаза – <i>Candida albicans</i>
REC1	рекомбинация – <i>Ustilago maydis</i>

регуляция приводит к быстрой активации p34 в ответ на изменяющиеся условия среды.

2-я группа G1-специфической экспрессии генов требует другого регуляторного элемента MCB ("*MluI cell cycle box*", consensus 5'-GTGACGCGTNANNT-3'), так называемого сайта узнавания рестриктазой *MluI*. Эта последовательность узнается транскрипционным фактором MBF, состоящим из белков *Swi6* и *Mbp1*. Белок *Mbp1* связывается с ДНК, а белок *Swi6* - нет. Таким образом, белок *Swi6* является общим для обоих элементов SCB и MCB.

MluI-активационная система (MAS) контролирует белки, специфические для S-фазы. Как видно из табл. 3, большинство из них необходимы для репликации ДНК; индуцируется также пара циклинов CLN5 и CLN6, которые регулируют вход в S-фазу. Другие гены кодируют белки, участвующие в различных аспектах репарации ДНК (UNG1, RAD5, RAD51, RAD54). RAD51 участвует в рекомбинационной репарации ДНК. Его экспрессия вместе с генами синтеза ДНК под контролем *MAS* предполагает его возможную роль в S-фазе, например, в репарации пострепликативных повреждений. Известно, что у мутанта *rad51* повышена частота спонтанных мутаций и потерь хромосом. DBF4 и CDC46 могут участвовать в контроле S-фазы. NUF1 и NUP116 являются, по-видимому, компонентами нуклеоскелета и ядерных пор.

По-видимому, *MluI*-элемент регулирует не только репликацию ДНК, но и репликацию ядра. Но не все репликативные белки регулируются *MCB*, например, *dCMP*-диаминаза, *dUTP*-пирофосфатаза и дегидрофолатредуктаза не проявляют периодичности в регуляции. В то же время CLN1, помимо *MluI*-элемента, имеет и *SCB*-элемент.

Прохождение клеточного цикла регулируется генами CDC (*cell cycle division*). Активация транскрипции с *MCB*-элемента происходит после интервала, контролируемого геном CDC28, но до интервала, контролируемого геном CDC4 (поздняя *G1*). Гистоны транскрибируются после CDC4-зависимого интервала, и у них нет *MCB*-элементов.

Регуляция перехода G2/M

В инициации митоза центральным моментом является активация киназы p34 митотическими циклинами и образование комплекса *MPF* (*mitosis-promoting factor*).

На первых стадиях активации в качестве митотической киназы для ядерного деления необходима активация *Cdc28* циклинами *Clb1* и *Clb2*.

Перед митозом комплекс *Cdc28*-циклин поддерживается в неактивном состоянии в результате фосфорилирования по *Thr18* и *Tyr19*. *Tyr19* фосфорилируется периодически, максимум наблюдается на границе *S/G2* и не детектируется в фазах *M* и *G1*. Фосфорилирование *Tyr19* осуществляется киназой *SWE1*. Киназа *Swe1* циклинзависимая, так как фосфорилирует только комплекс *Cdc28-Clb2*. Это событие является критичным для вхождения в митоз. Однако

одного этого события не достаточно, т. к. замещение *Tyr* на *Phe* не приводит к преждевременному выходу из митоза у *S. c.* У *Cdc28* также фосфорилируется *Thr18*, однако ни киназа, ни фосфатаза не известны. В конце М дефосфорилирование *Tyr19* тирозинфосфатазой, кодируемой геном *MIN1*, составляет последний шаг в активации митотической киназы.

Фосфорилирование *Tyr19* увеличивается при УФ-облучении или остановке клеточного цикла гидроксимочевинной. Однако клетки, экспрессирующие нефосфорилированную аллель *CDC28-Y19F*, не отличаются от клеток дикого типа в отношении остановки, обусловленной повреждениями ДНК или недорепликацией. Существует связь между фосфорилированием *Tyr19* и появлением почки.

Регуляция выхода из митоза

В фазе *G1* белок *Cdc14* заперт в ядрышке в результате ассоциации с ингибирующим фактором *Cfi1* (рис. 6). После деградации ингибитора циклин-зависимой киназы (CDK) *Sic1* накапливается митотическая форма *Cdc28*. Это приводит к синтезу ДНК, вступлению в митоз и активации APC (*anaphase-promoting complex*). APC катализирует разрушение анафазного ингибитора *Pds1* и инициацию анафазы, а также инициирует сигналпередающий каскад, который высвобождает *Cdc14* из ядрышка. Активный *Cdc14* облегчает инактивацию митотической *Cdk1* посредством активации *Cdh1* и накопления *Sic1*. Инактивация *Cdk1* обеспечивает клеточное деление, разрушение веретена и вступление в интерфазу.

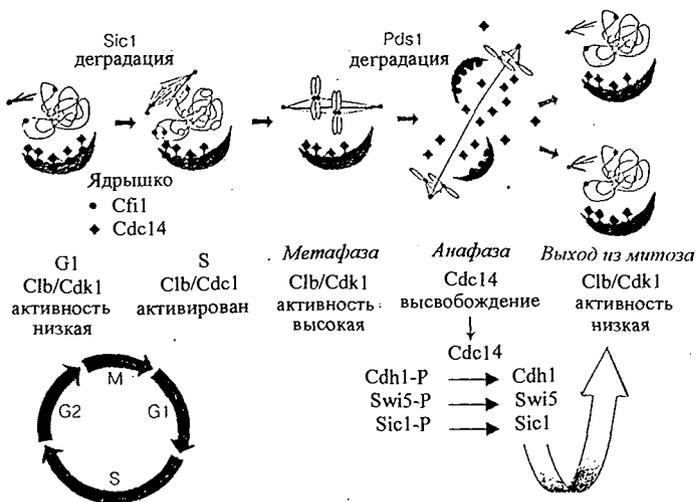


Рис. 6. Модель регуляции Cdc14 в процессе клеточного цикла

В течение фаз *G1*, *S* и ранней *M* пул *Cdc14* удерживается в ядрышке в качестве субъединицы RENT-комплекса, который также содержит *Sir2* и *Net1* (рис.7). Как только клетки достигают анафазы *Tem1*-зависимым способом, *Cdc14* и частично *Sir2* высвобождаются от *Net1* из RENT-комплекса. *Cdc14* выходит из ядра в цитоплазму, где модифицирует фосфорилируемое состояние белков, участвующих в протеолизе *Clb2* (*Hct1*) и транскрипции *SIC1* (*Swi5*). RENT-комплекс затем вновь собирается, раз уж *Clb/Cdk*-активность утолила свой голод и *Tem1*-зависимый сигнал закончился, возможно отрицательной обратной связью, которая включает *Cdc14*-зависимое дефосфорилирование *Net1*.

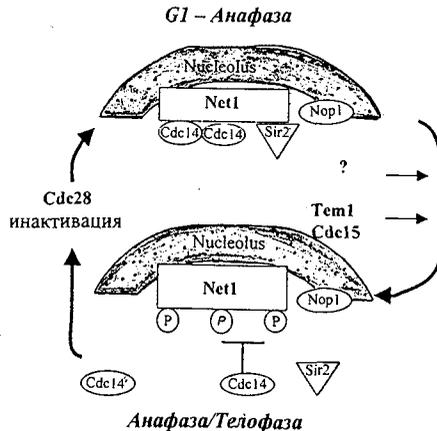


Рис. 7. Гипотеза RENT-контроля

МЕХАНИЗМ CHECKPOINT - КОНТРОЛЯ

Феноменология

Для успешного завершения деления клеточные события должны следовать друг за другом в строго определенном порядке. Например, митоз-специфические процессы запускаются только после завершения репликации ДНК. Как уже говорилось, такая зависимость последующих событий от завершения предыдущих находится под регуляторным контролем, названным *checkpoint*. Если происходит нарушение в прохождении, то деление клетки задерживается. Такая стратегия обеспечивает высокую надежность передачи генетического материала потомству клеток.

Рассмотрим этот механизм на конкретном примере. Ген *RAD9* - это первый компонент *checkpoint*-контроля, идентифицированный у дрожжей. Температурочувствительные мутанты, дефектные по функциям репликации ДНК (ДНК-полимераза I, *cdc17*; ДНК-полимераза III, *cdc2*; ДНК-лигаза, *cdc9*), не могут при

рестриктивной температуре вступить в митоз. Однако если имеется дефект в гене RAD9, то клетки продолжают митоз и вступают в следующий цикл.

Временная инактивация ДНК-лигазы не летальна для большинства клеток, как показывает способность *cdc9*-мутантных клеток сохранять выживаемость после краткой инкубации при рестриктивной температуре. Однако в отсутствие RAD9 дефектные по ДНК-лигазе клетки гибнут гораздо быстрее при рестриктивной температуре. Таким образом, освобождение митоза от зависимости от завершения репликации ДНК летально при блокировании завершения синтеза ДНК.

Повреждения ДНК могут возникать как при прохождении клеткой внутренних процессов, так и в результате внешнего воздействия. Повреждения ДНК вызывают замедление или задержку деления. Изучение остановок на различных стадиях клеточного цикла целесообразно изучать не на экспоненциальных культурах, представляющих собой смесь клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, а на культурах клеток, синхронизированных в определенных фазах клеточного цикла.

Для синхронизации гаплоидных культур в фазе *G1* клетки обрабатывают феромоном спаривания. Для характеристики *G1/S*-задержки после обработки повреждающим агентом можно воспользоваться следующими критериями: вступление в *S*-фазу оценивать по появлению почки или измерять количество ДНК, используя поточную цитометрию.

При УФ-облучении экспоненциальной гаплоидной культуры, синхронизированной в *G1* α -фактором, наблюдается дозовая зависимость задержки в появлении почки.

Метод жидкостной цитометрии позволяет определить количество ДНК и долю клеток в фазах *G1* и *G2* клеточного цикла. Это более чувствительный метод для определения остановки в *G1*, чем появление почки. При этом наблюдается появление почки в условиях, когда *G1*-профиль ДНК еще заметно не изменился.

G1-остановка осуществляется в *G1* на участке за точкой, чувствительной к α -фактору, но до появления почки и синтеза ДНК. После удаления α -фактора клетка еще в течение 20 минут остается способной к задержке деления после облучения.

Однако имеются данные о существовании по крайней мере еще одной остановки, локализованной между стадиями, контролируемые генами CDC4 и CDC7. Показано, что после стадии, контролируемой геном CDC7, не функционирует RAD9-зависимый *G1-checkpoint*-контроль.

Облучение клеток в стадии *G1* также вызывает замедление прохождения репликации ДНК. Как показывает поточная цитометрия, повреждения ДНК при непрерывной обработке низкими концентрациями MMS (0,015%) удлиняют фазу *S* у асинхронных культур дикого типа до 3-4,5 ч (вместо 30 мин). В присутствии 0,033% MMS синхронные культуры не завершали репликации спустя 180 мин после освобождения от α -фактора.

Для анализа задержки деления облученных *G2*-клеток культуру синхронизировали ингибитором микротубулина (МБС). Восстановление после облучения и выдерживания с МБС оценивали по времени, необходимому для

клеток с большой почкой образовать третью клетку, что является сигналом S-фазы следующего деления. Более 80% необлученных клеток дикого типа достигают следующего клеточного цикла спустя 6 часов. Облучение задерживает цикл. Задержка тем дольше, чем выше доза (каждые 2 крад приводят к задержке на 1 час). Однако у мутанта *rad9* аналогичной индуцированной радиацией задержки не обнаружено.

У дрожжей охарактеризовано 6 точек остановки в ответ на повреждения ДНК или блок репликации ДНК. В митотическом цикле ДНК-повреждения могут подавлять переход из фазы G1 в фазу S (*G1/S-checkpoint*); замедлять прохождение фазы S (*intraS-checkpoint*) и задерживать переход из фазы G2 в M (*G2/M-checkpoint*). Гены *checkpoint*-контроля также необходимы для предотвращения вступления в митоз, когда фаза S ингибирована гидроксимочевинной (HU) (*S/M-checkpoint*). В мейотическом цикле *checkpoint*-контроль также функционирует, замедляя вступление в мейоз I, пока не завершится рекомбинация (*checkpoint* в мейотической профазе). Помимо контроля завершения репликации и вступления в митоз, обнаружен регуляторный механизм, осуществляющий начало цитокинеза только после сегрегации хромосом. У *S. c.* мутации, нарушающие митотическое веретено, также ведут к остановке клеточного цикла и этот процесс опосредуется морфологическим *checkpoint*.

Отбор мутантов

Для отбора мутантов по *checkpoint*-генам использовали несколько способов:

- *Прямой скрининг уже известных генов радиочувствительности.* Нарушения *checkpoint*-контроля приводят к повышению радиочувствительности клеток. Оказалось, что среди известных генов RAD к *checkpoint*-контролю имеют отношение гены RAD9, RAD17, RAD24 и RAD53.

- *Использование синтетической летальности в компаунде с мутацией cdc13.* Клетки *cdc13* останавливаются в G2-фазе при рестриктивной температуре. Эта остановка вызвана наличием повреждений ДНК в теломерной области. Остановка клеточного цикла у мутанта *cdc13* обусловлена *checkpoint*-контролем, так как зависит от функционирования группы *checkpoint*-белков, таких как *Rad9*. Клетки двойного мутанта *cdc13 rad9* утрачивают способность останавливаться в G2/M-фазе при рестриктивной температуре и быстро теряют жизнеспособность. По-видимому, клетки вступают в митоз с поврежденной ДНК, что и ведет к их гибели. Эта стратегия используется для поиска мутантов с дефектным *checkpoint*-контролем. Таким способом удалось отобрать мутации *mec* (*mitosis entry checkpoint*): MEC1, MEC2 (=RAD53), MEC3 и CDC28.

- *Использование синтетической летальности при выдерживании с гидроксимочевинной.* Отобрали мутации *sad* (*S-phase arrest-deficient*) в генах SAD1 (SAD1=MEC2=RAD53) - SAD5.

- Использование чувствительности к ингибитору микротубулина - беномилу. Отобрали мутации *bub* (*budding uninhibited by benzimidazole*) в генах BUB1- BUB3и *mad* (*mitotic arrest deficient*) в генах MAD1- MAD3.

Таблица 4. Гены, участвующие в *checkpoint*-ответе на разных стадиях клеточного цикла дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

G1	S		G2	Мейоз I	Метафаза
	UV/MMS	HU			
RAD9	MEC1	POL2	RAD9	RAD17	MAD1
RAD17	RAD53	DPB11	RAD17	RAD24	MAD2
RAD24	RFC5	RFC5	RAD24	MEC3	MAD3
MEC3	PR11	MEC1	MEC3	MEC1	BUB1
DDC1	RPA	RAD53	DDC1		BUB2
MEC1	RAD9		MEC1		BUB3
RAD53	RAD17		RAD53		MPS1
PR11	RAD24		DUN1		CDC55
SWI6	MEC3		PDS1		CDC20
RPA	DDC1				APC
					PDS1

Генетический контроль

В настоящее время у *Saccharomyces cerevisiae* идентифицировано около двух десятков генов, участвующих в *checkpoint*-контроле (табл. 4). Вступление в фазу S задерживается, если повреждения индуцированы в G1 и этот контроль зависит от генов RAD9, RAD53/MEC2/SAD1/SPK1, MEC3, PR11, DDC1, RAD24. Гены RAD53, MEC1/ESR1, MEC3, RAD9, POL2, SGS1, PR11, RFC5, MEC2 также необходимы для *checkpoint*-регуляции, которая замедляет скорость синтеза ДНК, если ДНК повреждается в процессе S-фазы. Гены RAD9, RAD17 и RAD24 необходимы для прохождения S-фазы, но влияние мутаций в этих генах слабее, чем в генах RAD53 и MEC1. Повреждения ДНК, индуцированные в G2-фазе, вызывают задержку вступления в митоз, и этот контроль осуществляется продуктами генов RAD9, RAD17, RAD24, RAD53, MEC1, MEC3, PDS1/ESP2, DDC1. Наконец, гены RAD53, MEC1 и POL2 необходимы для остановки до первого мейотического деления, вызванной блокированием репарации двунитевых разрывов у мутанта *dmc1*.

Вхождение в митоз предотвращается не только в ответ на повреждение хромосом ДНК-повреждающими агентами, но и в ответ на незавершенную репликацию ДНК. Клетки, обработанные гидроксимочевинной (HU),

ингибирующей репликацию ДНК, останавливаются в фазе *S* и, таким образом, избегают вступления в митоз. Гены *MEC1* и *MEC2* необходимы для этой остановки и определяют дополнительный регуляторный путь, отличный от индуцированного повреждениями ДНК. Так как мутанты *mec1* и *mec2* также дефектны по *G2*-остановке, индуцированной радиацией, эти гены могут играть роль негативного контроля, включаемого как недорепликацией, так и повреждениями ДНК.

Сигнал запуска *checkpoint*-механизма

Генотоксичные агенты вызывают разнообразные типы первичных повреждений, которые преобразуются затем во вторичные в процессе репликации поврежденной матрицы. Репликация ДНК через одностороннюю вилку, вероятно, вызывает коллапс репликативной вилки и образование двунитевого разрыва. Односторонняя брешь может образоваться, если репликация остановлена перед ковалентно модифицированным основанием, и синтез ДНК возобновляется, перескочив через повреждение.

По крайней мере в двух случаях показано, что сигналом является онДНК. Это остановка клеток с дефектом репликации концов хромосом и остановка в процессе мейотической рекомбинации. В процессе митотической остановки RAD9-класс генетических продуктов, по-видимому, процессирует некоторые образованные повреждения ДНК в одностороннюю форму в результате деградации ДНК. Возможно, деградация *checkpoint*-белками необходима для остановки. *Checkpoint*-гены, осуществляющие мейотическую остановку, также коррелируют с присутствием онДНК, хотя онДНК в данном случае образуется другими нуклеазами. Предполагают, что все типы повреждений вызывают остановку, образуя онДНК. Однако действительно ли онДНК и *checkpoint*-белки ассоциируют и как они затем вызывают остановку, пока не ясно.

Клетки дрожжей, дефектные по топоизомеразе II или гистону 2В, по-видимому, проходят через RAD9-зависимую остановку, и, следовательно, нарушения структуры хроматина, ожидаемые у этих мутантов, не детектируются геном RAD9.

Единичный двунитевой разрыв, если он нерепарирован, индуцирует остановку.

УФ-индуцированные повреждения (пиримидиновые димеры или фотопродукты), по-видимому, не являются сигналами для остановки. У *rad14*, дефектного по эксцизионной репарации, УФ-лучи вызывают задержку, но она не RAD9-зависимая. А если облучать γ -лучами, то наблюдается типичная RAD9-зависимая остановка как для *rad14*, так и *rad2*. Предполагают, что сигналом *checkpoint*-остановки служат повреждения, образованные в процессе NER, например односторонние вилки или треки онДНК, двунитевые разрывы.

Сенсоры

Сенсорные белки ассоциируют напрямую с повреждениями ДНК или застрявшей репликативной вилкой. Существует 2 группы сенсорных генов, для простоты обозначенные как RAD9 и POL2. Класс RAD9-генов кодирует белки, узнающие повреждения ДНК, и вызывает остановку в *G1* и *G2*, замедляет прохождение репликации ДНК. POL2-класс генов кодирует белки, узнающие застрявшую репликативную вилку, и вызывает остановку в *S*-фазе. Оба типа сенсоров каким-то образом активируют общий сигнальный путь, который, по-видимому, опосредует специфические ответы в результате фосфорилирования мишеней-субстратов.

Гены RAD9, RAD17, RAD24, MEC1, DDC1 нужны для остановки клеточного цикла при индукции повреждений ДНК и функционируют на любой стадии клеточного цикла. Они образуют 2 эпистатические группы (RAD9 и RAD24).

Наоборот, белки ДНК-полимераза ϵ , *Rfc5* и *Sgs1*, по-видимому, реагируют на блок репликации под действием HU и другие повреждения ДНК в процессе синтеза. ДНК-полимераза ϵ (репликативная ДНК-полимераза) вместе с геликазой *Sgs1*, по-видимому, образуют сигнал, который активирует *Mec1* и *Rad53*. *Rfc5* является субъединицей репликативного фактора C (RF-C). Этот комплекс, после связывания с матричным праймером, загружает PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) на ДНК, таким образом мобилизуя ДНК-полимеразу к сайту репликации ДНК. Субъединицы RF-C имеют сходство между собой и с белком RAD24.

Предполагается, что белки *Rad17*, *Rad24*, *Rad9*, *Mec1* и *Ddc1* непосредственно взаимодействуют с поврежденной молекулой ДНК. Это предположение основано на изменении степени деградации дунитевой и одонитевой молекул ДНК у этих мутантов; ограниченной гомологии *Rad17* и *Rec1*, 3'-5'-экзонуклеазы *Ustilago maydis*, а также гомологии *Rad24* и репликативного фактора C.

Передача сигнала

Предполагается, что белки-сенсоры активируют серию протеинкиназ (ПК), передатчиков сигнала, кодируемых генами MEC1 и, возможно, TEL1, RAD53 и DUN1. Эти ПК передают сигнал и модифицируют клеточный ответ за счет фосфорилирования соответствующих белков-мишеней. Не ясно, действительно ли ген TEL1, последовательность которого гомологична последовательности гена MEC1, функционирует в *checkpoint*-контроле; мутант *tell* не имеет детектируемого дефекта *checkpoint*-контроля, хотя сверхэкспрессия TEL1 может восстановить некоторые остановки у *checkpoint*-мутантов.

Существует двухступенчатая передача сигнала ПК, MEC1 и RAD53. По молекулярным и генетическим данным, ген MEC1 функционирует до гена RAD53. По-видимому, *Mec1* активирует *Rad53*, фосфорилируя его после повреждения ДНК. Активированный *Rad53* может регулировать мишенные белки последующим актом фосфорилирования. Почему существует два уровня киназ, не

ясно. Две серии ПК могут служить для размножения сигнала и/или могут регулировать различные подгруппы ответов. Не исключено, что MEC1 имеет дополнительную роль, которая RAD53-независимая, так как мутант *mec1* более чувствителен к УФ, чем *rad53*. MEC1-зависимый RAD53-независимый ответ включает фосфорилирование *Pds1*, G2/M-остановку и транскрипционную индукцию генов MEC1 и RAD53. MEC1 и RAD53, вероятно, необходимы для фосфорилирования многих субстратов. Действительно ли они фосфорилируют субстраты напрямую, не известно за исключением одного случая: RAD53-зависимое фосфорилирование *Swi6*. Последствия фосфорилирования белков-мишеней остаются неизвестными в большинстве случаев.

Предложена модель связывания и фосфорилирования белков. С онДНК ассоциируют *Rad17*, *Rad24*, *Mec3* и *Ddc1*. Для связывания *Mec3* с *Ddc1* требуется *Rad17* (и не нужны повреждения ДНК). Обе группы *Rad9* и *Rad24* активируют ПК *Mec1*, которая фосфорилирует по крайней мере 4 белка (*Rad9*, *Rad53*, *Pds1*, *Ddc1*). После облучения *Rad9* фосфорилируется, и фосфорилированный *Rad9* необходим для фосфорилирования *Rad53* в домене FHA2 (*fork head associated domain*), участвующего в остановке клеточного цикла. Мутации в FHA2-домеене снимают остановку в G2/M и транскрипцию индуцированных репарационных генов. Хотя сенсорные белки физически взаимодействуют друг с другом, не обнаружено их физического взаимодействия с *Mec1*.

Известно, что для фосфорилирования белков *Rad53* и *Pds1* требуется белок *Mec1*. Белки *Rad9* и *Ddc1* функционируют до *Mec1*, но фосфорилируются после *Mec1*. Предполагается, что оба класса белков *Rad9* и *Rad24* могут направлять протеинкиназу *Mec1* фосфорилировать специфические субстраты, причем ПК *Mec1* может направляться *Rad9*-белком к белкам *Rad53* и *Pds1*, а *Rad24*-белком к белкам *Rad53* и *Ddc1*.

G1/S-checkpoint

У дрожжей повреждения ДНК активируют ПК *Rad53*, которая инактивирует транскрипционный регулятор *Swi6*, ингибирующий транскрипционный активатор *Swi4* транскрипции G1-циклинов (гены CLN) (рис. 8а). Мутант *Swi6* - первый мутант у дрожжей с очевидным дефектом только G1/S-checkpoint, хотя роль гена SWI6 в других остановках формально не тестировалась. Таким образом, CDK-циклины, в норме необходимые для G1/S-перехода, инактивируются после повреждения молекулы ДНК. У дрожжей остановка в G1/S и G2/M, по-видимому, обеспечивает время для репарации. У млекопитающих остановка в G1/S нужна не для репарации, а скорее для включения альтернативного пути, приводящего к гибели клетки (апоптозу).

IntraS-checkpoint

Анализ скорости прохождения репликации ДНК при обработке синхронизированных культур клеток позволил идентифицировать *intraS-checkpoint*. Повреждения ДНК в условиях непрерывной обработки метилметансульфонатом (ММС) сильно удлиняют (на несколько часов) продолжительность S-фазы у клеток дикого типа. Некоторые мутации ускоряют репликацию ДНК, эффект наиболее выражен у мутантов *mecl* и *rad53*. Мутации в сенсорных генах (*rad9*, *rad24*, *ddc1*) имеют менее выраженный эффект, чем мутации *mecl* и *rad53*. Не известно, почему *Pole*-класс генов, необходимых для S/M-задержки, также необходим для *intraS-checkpoint*.

Ингибирование репликации ДНК может возникнуть на обеих стадиях: инициации и элонгации. Два направления работ показывают, каким образом MEC1 и RAD53 могут замедлять репликацию ДНК. Во-первых, идентифицирован мутант праймазы, полностью утративший задержку репликации при обработке ММС. ДНК-праймаза, участвующая как в инициации, так и в элонгации, может быть мишенью негативной регуляции генами MEC1 и RAD53. Во-вторых, повреждения ДНК могут замедлять репликацию, ингибируя поздние *ori*-сайты. Показано, что поздние *ori*-сайты находятся под генетическим контролем и в случае ингибирования репликации в ранней S (в результате обработки HU) происходит ингибирование поздних *ori*-сайтов. Это ингибирование поздних *ori*-сайтов требует интактных генов MEC1 и RAD53. Можно предположить, что после повреждения ДНК, когда движение репликативной вилки в основном замедляется, ингибирование репликации может быть частично обусловлено и ингибированием генами MEC1 и RAD53 поздних *ori*-сайтов.

Предложена модель для объяснения замедления репликации после повреждения ДНК (рис. 86). Показано, что после повреждения ДНК (1) сенсор активирует MEC1 и RAD53 (1a), вызывая замедление репликации (1b), действуя на ДНК-праймазу. Когда репликация ДНК блокирована (2), сенсор активирует MEC1 и RAD53 (2a), которые затем оба блокируют митоз (2c) и ингибируют инициацию репликации с поздних *ori*-сайтов (2b).

S/M-checkpoint

Когда репликация ДНК блокирована, например, гидроксимочевинной в результате истощения dNTP, митоз также останавливается. Этот сигнальный путь, *S-checkpoint*, проверяет завершение репликации ДНК и предотвращает митоз, пока репликация не закончится. Незавершенная репликация и остановка репликативной вилки, вызванные истощением пулов диоксирибонуклеотидов, вероятно, чувствуются ДНК-полимеразой ϵ (POL2), Dpb11p, Rfc5. Сенсорные *checkpoint*-гены, необходимые специально для *S/M-checkpoint*, включают POL2.

Все гены, необходимые для *S/M-checkpoint*, жизненно важны, что затрудняет анализ их роли в *checkpoint*-ответе. Об этом ответе очень мало что известно.

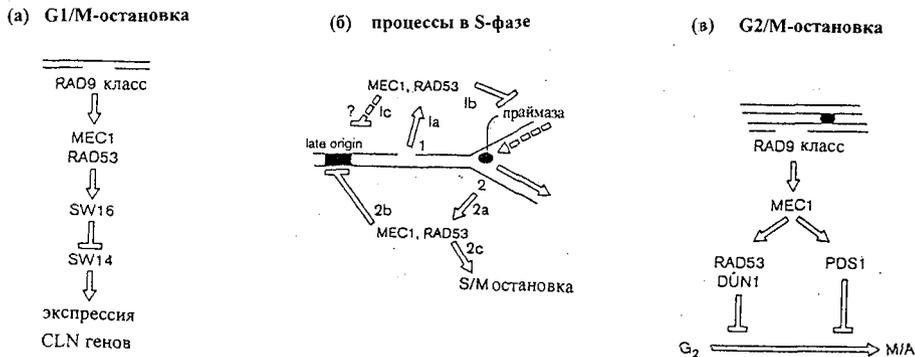


Рис. 8. Схемы генетического контроля остановок на разных стадиях клеточного цикла: G1/S-остановка (а), S-фазовые ответы (б), G2/M-остановка (в)

Для *S/M-checkpoint* необходимы белки *Pol ε*, *Rfc5*, *Dpb1* и *Sgs1*. Все белки имеют существенные функции в репликации, но в каждом случае показано, что их роль в *S/M-checkpoint* не зависит от их роли в репликации. Так, для *Pol ε* мутации, влияющие на *checkpoint*-контроль, локализованы в С-конце на большом расстоянии от каталитического домена, содержащего *zinc-finger*. Для передачи сигнала необходимы *Mec1* и *Rad53*. Активация репликативного *checkpoint* при обработке HU индуцирует фосфорилирование *Rad53p*, которое зависит от *Mec1*.

G2/M-checkpoint

Наиболее хорошо изучен *G2/M-checkpoint* при индукции повреждений ДНК. Частично это связано с тем, что большинство участвующих генов не являются жизненно важными, что облегчает генетический анализ. Повреждения ДНК индуцируют длительную остановку в митозе. Идентифицировано много генов, но как они взаимодействуют и вызывают остановку, не известно. Генетические исследования позволяют предполагать существование параллельных путей (см. рис. 8в). Ключ к решению этой проблемы лежит в идентификации еще неизвестных генов-мишеней, которые регулируются *RAD53* и *PDS1*. Регуляция

анафазного ингибитора *Pds1* включает комплекс APC, и, следовательно, предполагается участие этого комплекса в остановке клеточного цикла в результате индукции повреждений ДНК.

Мишенью метафазного *checkpoint* является *Pds1*, ингибирующий переход метафаза/анафаза. Сохранение активности *Cdc28*, по-видимому, необходимо для метафазной остановки у *S. c.* Мутации, снижающие активность *Cdc28*, сокращают метафазную остановку. Предполагают, что для предотвращения анафазы необходимы и активность *Cdc28*, и стабильность *Pds1*. Таким образом, метафазный *checkpoint* работает как через стабилизацию *Pds1 Rad53*-независимым путем, так и сохранением активности *Cdc28 Rad53*-зависимым путем.

По-видимому, два параллельных пути отражают независимую регуляцию переходов *G2*/метафаза и метафаза/анафаза. Известно, что поврежденные клетки останавливаются либо в *G2*-подобном состоянии, либо в метафазоподобном. Различение двух стадий клеточного цикла у дрожжей, *G2* и *M*, затруднено, так как они отличаются немногими молекулярно-цитологическими характеристиками. Хромосомы слабо конденсируются, ядерная оболочка при митозе не разрушается. Кроме того, *G2*- и метафазные клетки имеют короткое веретено. Однако для различения этих фаз используют анализ хромосомной конденсации и статус фосфорилирования *Cdc28*. В *G2*-подобных (интерфазных) клетках хромосомы относительно конденсированы и по крайней мере часть *Cdc28* дефосфорилирована. Использование этого критерия позволило предположить, что клетки способны останавливаться в фазе *G2*. Клетки, находящиеся в метафазе, могут останавливаться после повреждения ДНК, так как наблюдается RAD9-зависимая остановка при облучении метафазных клеток с использованием ингибитора тубулина. Для этой остановки существенен ген *PDS1*, по-видимому, ингибитор прохождения *M*/анафаза. И, наконец, показано, что клетки могут останавливаться даже после начала анафазы. Эта точка проверки (*mid-anaphase-checkpoint*) RAD9-зависимая и запускается растягиванием или разрывом дицентрических хромосом в начале анафазы.

***Checkpoint*-контроль сборки веретена**

В процессе митоза две дочерние клетки получают по одной копии каждой хромосомы. Сестринские хроматиды через специальный комплекс ДНК-белок, известный как кинетохора, присоединяются к микротубулину, отходящему от противоположных полюсов митотического веретена. Только когда все кинетохоры связаны с микротубулином, митотическое веретено осуществляет расхождение хроматид. Правильность передачи хромосом обеспечивается *checkpoint*-контролем. Этот механизм проверяет правильность присоединения кинетохор к микротубулину и, в случае обнаружения дефекта, ингибирует разделение сестринских хроматид и, таким образом, вхождение в анафазу.

Генетические исследования выявили несколько компонентов контроля веретена. Идентификация гомологов у высших эукариот показывает консервативность этого механизма.

Расхождение сестринских хроматид запускается юбиквитинзависимой деградацией, опосредованной юбиквитином, регуляторов сцепления сестринских хроматид. Комплекс из множества субъединиц юбиквитинлигазы, известный как циклосомы или комплекс APC (*anaphase-promoting complex*), юбиквитинирует регуляторы сегрегации сестринских хроматид, *Pds1*, приводя к их разрушению протеосомой. APC-зависимый протеолиз важен не только для разделения сестринских хроматид, но и для второго этапа митоза. APC-зависимый протеолиз участвует в запуске выхода из митоза в результате деградации митотических циклинов.

У почкующихся дрожжей утрата сцепления в кинетохорах, вероятно, не активирует путь *checkpoint*-контроля, неприсоединение самих кинетохор *per se*, вероятнее всего, является сигналом.

В передаче сигнала важную роль играет фосфорилирование белков. Идентифицировано две протеинкиназы, MPS1 и BUB1, необходимые для остановки клеточного цикла в ответ на дефект веретена, и белок *Mad1*, который специфически фосфорилируется при активации *checkpoint*-контроля веретена. Генетический анализ показал, что взаимодействия между компонентами сложные. Показано, что *Mad1* фосфорилируется *checkpoint*-зависимым способом и сверхэкспрессия MPS1 или мутантная форма BUB1 приводят к конститутивной активации *checkpoint*-контроля веретена. В ответ на сигнал о дефекте веретена или неприсоединенных кинетохорах MPS1 фосфорилирует *Mad1* BUB1, BUB3, MAD2-зависимым способом.

В ответ на неприсоединенные кинетохоры *checkpoint*-контроль веретена задерживает прохождение клеточного цикла до анафазы (рис. 9). Компоненты этого пути *Mad2*, *Bub1* и *Bub3* связываются с неприсоединенной кинетохорой, потенциально образуя белковый комплекс, который содержит также *Mad1*, *Mad3* и другие белки. Данный комплекс катализирует образование комплекса Cdc20-APC-MAD2. Это комплексное образование делает Cdc20-APC неактивным, предотвращая юбиквитинирование субстрата APC. Предотвращение деградации *Pds1* приводит к метафазной остановке. Когда дефект веретена отрепарирован и все кинетохоры присоединятся к микротубулину, *Mad2* и, возможно, другие компоненты комплекса диссоциируют из Cdc20-APC-комплекса. Теперь активный Cdc20-APC-комплекс юбиквитинирует анафазный ингибитор *Pds1*, и, таким образом, инициируется разделение сестринских хроматид, что позволяет клеткам вступить в анафазу. У почкующихся дрожжей *Mad1*, *Mad2* и *Mad3* ассоциированы с Cdc20-APC-комплексом в процессе всего клеточного цикла.

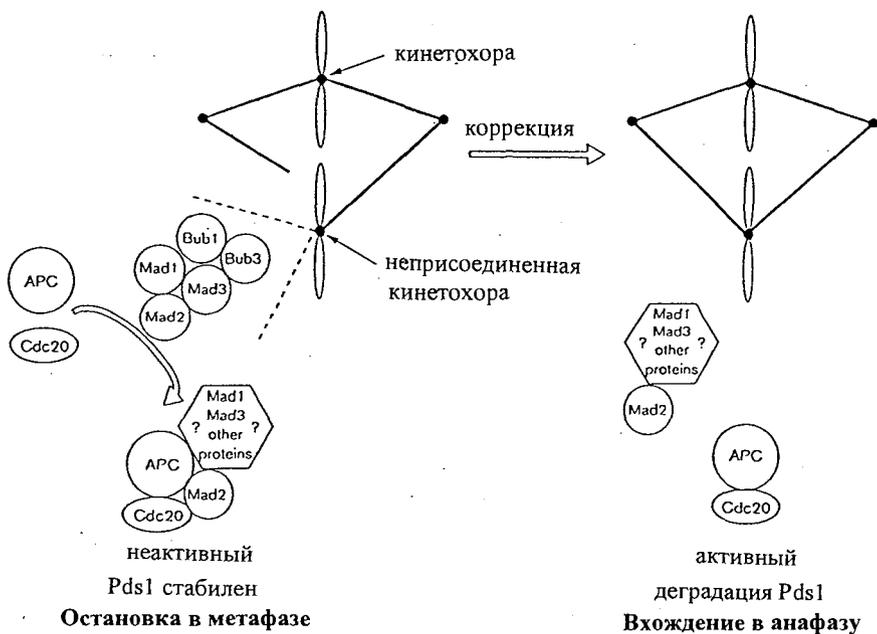


Рис. 9. Модель *checkpoint*-контроля целостности веретена при прохождении клеточного цикла

Checkpoint-контроль образования почки

Checkpoint-контроль морфогенеза замедляет деление ядра, а следовательно, прохождение клеточного цикла в случае нарушения образования почки. Образование почки требует устойчивой поляризации актинового цитоскелета, начинающейся в конце *G1*. *Checkpoint*-контроль морфогенеза осуществляет задержку деления ядра в *G2*-фазе в клетках, не способных к поляризованному росту. Это обеспечивает достаточно времени для восстановления актинового цитоскелета от проходящей деполяризации и построения почки до деления ядра. Таким образом предотвращается превращение клетки в биядерную.

Для функционирования этого контроля необходим ген *SWE1*, кодирующий протеинкиназу, ингибирующую основную киназу клеточного цикла *Cdc28*. *Checkpoint*-контроль морфогенеза регулируется ингибирующим фосфорилированием У19 ПК *Cdc28*. Задержка деления ядра полностью элиминируется мутациями, предотвращающими фосфорилирование *Tyr19* у *Cdc28* (*CDC28*^{Y19F}), или сверхэкспрессией гена *MIN1*. Остановка в *G2*, индуцированная *checkpoint*-контролем, включает ингибирование основной CDK, *Cdc28*, киназой *Swe1*. Изучение нефосфорилируемой аллели *CDC28*(Y19F) предполагает, что

checkpoint-контроль стимулируется двумя путями ингибирования: один осуществляется через фосфорилирование *Tyr19*, а второй, плохо изученный, не требует фосфорилирования *Tyr19*. Получен новый мутант CDC28(E12K), резистентный к *Swe1*-опосредованному ингибированию. *Swe1* способен ингибировать CDC28(Y19F) независимо от способа фосфорилирования *Tyr19*. Оба пути *checkpoint*-контроля, зависящий от фосфорилирования Y19 и независимый, осуществляют ингибирование *Cdc28* киназой *Swe1*. Показано, что мутант *Swe1*, утративший каталитическую активность, способен существенно замедлять клеточный цикл *in vivo* в процессе *checkpoint*-контроля.

Роль *Cdc28* в *G2/M-checkpoint*

Исследования на *S. pombe* и млекопитающих приводят к заключению, что остановка клеточного цикла в ответ на ингибирование репликации или повреждение ДНК является результатом действия CDK. Можно предположить, что ингибирование активности CDK составляет основу механизма *checkpoint*-контроля.

У делящихся дрожжей, клеток млекопитающих и филаментных грибов *G2/M*-остановка после повреждения ДНК осуществляется посредством ингибирования p34/Cdc28. У этих организмов *G2/M*-остановка, по-видимому, происходит как в результате поддержания ингибитора p34, ПК *wee1*, так и в результате инактивации активатора CDC25.

У *S. pombe* фосфорилирование *Tyr15* ПК p34/Cdc2 связывает инициацию митоза с завершением репликации. Однако чувствительный к HU мутант *cdc2.3* сохраняет способность к остановке клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК. Кроме того, показано, что киназа *wee1*, негативный регулятор p34/cdc2, не является необходимой для остановки митоза повреждениями ДНК. Клетки, дефосфорилированные по *Wee1*, чувствительны к повреждениям, индуцированным УФ- или γ -излучением. Было показано, что *checkpoint*-контроль повреждений ДНК опосредован протеинкиназой *Wee1*, так как клетки, дефектные по *Wee1*, утрачивают задержку после γ -облучения. Однако впоследствии было показано, что дефект по *Wee1* имеет нормальный арест после повреждения ДНК. При этом фосфорилирование *Tyr15* не анализировалось. Таким образом, роль фосфорилирования *Tyr15* ПК p34/Cdc2 в *G2/M-checkpoint*-контроле повреждений ДНК остается неясным у дрожжей.

Эти наблюдения служат аргументами против прямого участия киназы p32/cdc2, но другая киназа, кодируемая геном *chk1*+, возможно, играет роль в *G2*-задержке, вызванной повреждениями ДНК.

Эlegantные исследования, проведенные на делящихся дрожжах, показали, что *Chk1* действует прямо через *Cdc25*, а не через ПК *Wee1* и *Mik1*, хотя они нужны для сохранения остановки. Как показано на схеме (рис. 10), повреждение ДНК активирует протеинкиназу *spRad3*. Активная протеинкиназа *spRad3* в свою очередь активирует ПК *Chk1*; активированная ПК *Chk1* в свою очередь

активирует фосфатазу *spCdc25*, активатор протеинкиназы *spCdc2*, в результате фосфорилирования *spCdc25* по *Ser 216*. Связывание с белками *14-3-3*, кодируемыми генами *rad24* и *rad25*, инактивирует фосфатазу, предотвращая активирование киназы *Cdc2*, и вызывает остановку клеток в *G2*. Ключевым в этих исследованиях был тот факт, что нефосфорилируемая аллель *p34, CDC2Y15F*, остается активной при прохождении *M*-фазы, но дефектна по остановке в результате повреждения ДНК.

У *Aspergillus nidulans* фосфорилирование *Tyr15* ПК *p34* в *G2*-фазе связывает инициацию митоза с завершением репарации ДНК, так как клетки, не способные фосфорилировать *Tyr15* ПК *p34*, дефектны по задержке в *G2*-фазе, вызванной повреждениями ДНК, и вступают в митоз после облучения, что ведет к их чувствительности к повреждающему действию.

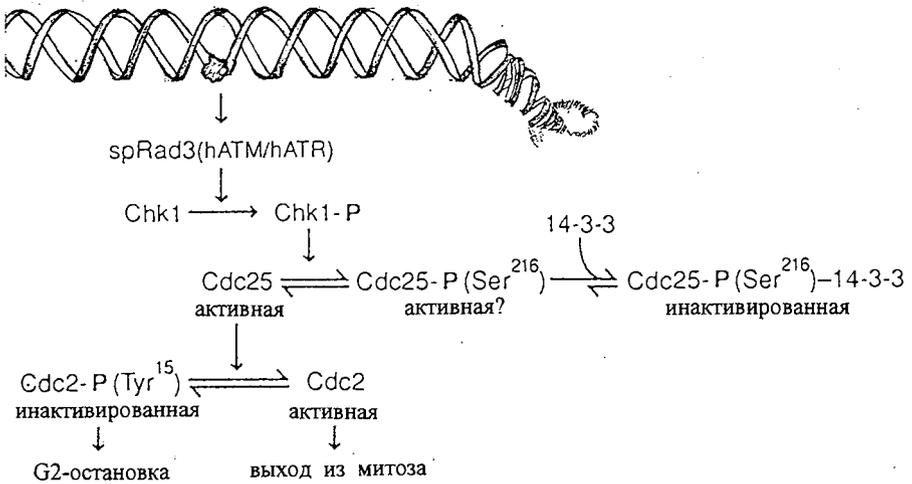


Рис. 10. Схема *G2*-остановки в результате повреждения ДНК у дрожжей *S. pombe*

На клетках *HeLa* показано, что у мутанта CDC2AF, не способного фосфорилировать *Thr14* и *Tyr15*, снижена задержка в *G2* после X-облучения. По-видимому, существует еще дополнительный механизм регуляции остановки в *G2/M*. В клетках человека нефосфорилируемая аллель *Cdc2* только частично дефектна по *G2*-остановке.

И наконец, остановка в фазе *S* при блокировании репликации ДНК может в некоторых типах клеток также нуждаться в фосфорилировании *Cdc2*, но в некоторых случаях остановка в фазе *S* включает другой механизм, не относящийся к фосфорилированию *Cdc2*. Более того, остановка в *G1* после повреждения ДНК в клетках млекопитающих может регулироваться как ингибитором *Cdk*-активности p21, так и активностью *Cdk4*, ингибирующей фосфорилирование тирозина.

Однако у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* клетки, несущие конститутивно-активную нефосфорилированную аллель *cdc28F19* гена CDC28, не являются сверхчувствительными к НУ, у них не нарушена *G2*-индуцированная остановка. По-видимому, оба *checkpoint*-контроля могут оперировать независимо от фосфорилирования. Было показано, что у клеток, остановленных в *G2/M* в результате повреждения ДНК или ингибирования репликации ДНК, наблюдается высокий уровень активности митотической CDK. С другой стороны, оба процесса, и репликация ДНК, и *checkpoint*-контроль индуцированных повреждений ДНК, функционируют у дрожжей, утративших способность фосфорилировать *Tyr* у p34. Таким образом, оставалось загадкой, что p34 не играет роли в *checkpoint*-контроле после повреждения ДНК. Однако в дальнейшем были получены мутации в гене CDC28, позволившие выявить участие протеинкиназы в *checkpoint*-регуляции. Например, получили мутант p34, утративший свои функции и имеющий дефект по *G2/M*-остановке и дефект по остановке при повреждении веретена, а также было показано, что фосфорилирование *Tyr* играет роль в контроле образования почки.

Мутация *cdc28-5M* рецессивна, представляет собой 5 замен, температурочувствительная, приводит к потере активности CDK, включая ассоциированную с *Clb2*, *Clb5*, *Clb6*, но не с *Clb3*. (Известно, что *Clb1* и *Clb2* накапливаются в *G2* и имеют пик в *M*, а *Clb3* и *Clb4* начинают накапливаться в начале фазы *S* и сохраняются на высоком уровне до митоза. Активность комплекса *Clb-Cdc28* определяется с использованием в качестве субстрата гистона H1.) Мутация позволяет продолжить клеточный цикл, несмотря на присутствие повреждений или нокодазола - ингибитора микротубулина. Эти данные позволяют предположить, что киназа *Cdc28* у почкующихся дрожжей необходима для остановки клеточного цикла в результате повреждения ДНК или в результате неправильной сборки митотического веретена.

ИНДУКЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Помимо активации *checkpoint*-контроля, повреждения ДНК вызывают быструю индукцию транскрипции многих генов, в том числе и некоторых репаративных генов. Стоит отметить, что:

- индукция не имеет специфичности и гены индуцируются различными химическими и физическими агентами;
- множество индуцибельных генов имеют некоторое перекрытие с генами теплового шока (как и у *E. coli*). Однако ни один из хорошо известных репарационных генов не индуцируется тепловым шоком;
- гены с двойственной ролью, функционирующие как в репарации, так и в репликации ДНК, такие как CDC9, CDC8, CDC17 (POL1), являются клеточно-регулируемыми (*cell-cycle regulated*). Однако промоторные элементы, отвечающие за увеличение экспрессии CDC9 в S-фазе у необработанных клеток, по-видимому, отличаются от таковых, отвечающих за отклик на повреждение ДНК.

В ранних работах Раби оценил количество индуцибельных генов (около 50), при этом учитывал высокую степень индуцибельности УФ-лучами или MMS. Однако гены, участвующие в NER, характеризуются умеренной степенью индукции (вплоть до 6 раз).

Изучение с помощью новых *chip*-технологий показало, что обработка алкилирующим агентом MMS в умеренных дозах (1 ч, 0,1% MMS) вызывает увеличение (более чем в 4 раза) транскрипции у 325 генов (5,2 %) из имеющихся 6218 рамок считывания у дрожжей, из них у 32 генов индукция была более чем в 10 раз (максимум в 251 раз, YFL061w). У 75 рамок считывания наблюдалось снижение транскрипции более чем в 3 раза (из них у 24 более чем в 5 раз, у 10 - более чем в 7,5 раза, у 4 - более чем в 10 раз).

У *E. coli* гены по крайней мере трёх регулонов транскрипционно регулируются в ответ на специфические типы повреждений ДНК: алкилированные повреждения ДНК, окислительные повреждения и одонитевые разрывы ДНК. У эукариот транскрипция большого числа генов репарации ДНК увеличивается в ответ на широкий спектр сигналов поврежденной ДНК независимо от того, участвует ли продукт гена в репарации данного типа повреждения. Например, у дрожжей *S. c.* ген PHR1, кодирующий фототилазу, индуцируется как химическими агентами, так и УФ-лучами.

К индуцибельным генам относятся некоторые гены из всех основных групп репарации (табл. 5): необходимые для NER (RAD2, RAD7, RAD16, RAD23 и SNM1 (PSO2)), BER (MAG1), репарации сшивков ДНК (SNM1/PSO2), пост-репликативной репарации (RAD6 и RAD18), рекомбинационной репарации (RAD51 и RAD54) и фотореактивации (PHR1). В группу индуцибельных генов входят также такие гены, как CDC9 (ДНК-лигаза), CDC17 (ДНК-полимераза α), RNR1, RNR2, RNR3 (субъединицы рибонуклеотидредуктазы), которые участвуют в метаболизме ДНК, и гены, чьи функции в репарации ДНК не определены,

Таблица 5. Гены дрожжей, индуцибельные при действии ДНК-повреждающих агентов

Ген	Функция	ИТШ ^a	РКЦ ^b	Мейоз ^c
PHR1	Фермент фотореактивации	-		
RAD2	Нуклеотидная эксцизионная репарация	-	-	+
RAD7	Нуклеотидная эксцизионная репарация	-	-	+
RAD16	Нуклеотидная эксцизионная репарация			
RAD23	Нуклеотидная эксцизионная репарация	-	-	+
RAD5 (=REV2)	Геликазоподобный белок; необходим для мутагенеза, возможно, пострепликативной репарации.			
RAD6	Связывание с юбиквитином; необходим для мутагенеза, споруляции, пострепликативной репарации.	-	-	+
RAD18	Пострепликативная репарация	-	-	+
RAD51	Репарация двунитевых разрывов, рекомбинация		+	
RAD54	Репарация двунитевых разрывов, рекомбинация	-		+
SNM1 (=PSO1)	Репарация сшивков			
CDC8	Тимидилаткиназа		+	+
CDC9	ДНК-лигаза		+	+
CDC17(=POL1)	ДНК-полимераза I		+	+
UBI4	Полиубиквитин	+		+
MAG1	3-метилаленин-ДНК-гликозилаза	-		
RNR1	Рибонуклеотидредуктаза, большая субъединица		+	
RNR2	Рибонуклеотидредуктаза, малая субъединица	-	(+)	
RNR3 (=DIN1)	Рибонуклеотидредуктаза, большая субъединица	-		
DIN2	Неизвестна			
DIN3	Неизвестна			
DIN4	Неизвестна			
DIN5	Неизвестна			
DIN6	Неизвестна			
DDRA2	Неизвестна	+		
DDR48	АТФ. ГТФ-аза с неизвестной функцией; играет роль в спонтанном мутагенезе.	+		
Ty (DDR78A)	Дрожжевой транспозон			
HIS3	Метаболизм гистидина			
HIS4	Метаболизм гистидина			
	Различные неизвестные белки			
	Протеиназа В			
	Цитохром Р-450			
	Каталаза			

^a – индукция тепловым шоком; ^b – регуляция в процессе клеточного цикла; ^c – увеличение уровня транскрипции в мейозе. + означает индуцибельность в соответствующих условиях; (+) означает низкий уровень регуляции; - означает нерегулируемую экспрессию.

например UBI4, ген деградации. Однако в отличие от SOS-ответа нет доказательств координированной регуляции.

По крайней мере 5 генов абсолютно необходимы для инцизии повреждений ДНК: RAD1, RAD2, RAD3, RAD4 и RAD10. Анализ показал, что эти гены экспрессируются конститутивно на очень низком уровне. Индукция повреждений вызывает повышение транскрипционной активности лишь гена RAD2.

УФ-индукция транскрипции гена RAD2 происходит на стадии клеточного цикла вне фазы G1. Так, индукция катастрофически уменьшается, если клетки держатся в стационарной фазе или остановлены в фазе G1 α -фактором. Эти результаты противоположны данным, полученным для генов CDC9 и RAD54. В случае CDC9 обнаружено увеличение экспрессии после УФ-облучения в стационарной фазе, и, следовательно, оно не может быть результатом просто частичной синхронизации при остановке клеточного цикла. Однако позднее в работах с синхронными культурами было показано, что делетирование промоторного элемента DRE1 гена RAD2 увеличивает УФ-чувствительность клеток исключительно в фазе G1/S. Делеция по DRE2 приводит к увеличению УФ-чувствительности независимо от стадии клеточного цикла. Эти данные показывают, что нет прямой связи между экспрессией гена RAD2 и УФ-чувствительностью.

Транскрипция гена RAD6 является стадий-специфической и достигает максимума в поздней S/ранней G2, на стадии, по-видимому, специфичной для пострепликативной репарации ДНК. УФ-индукция транскрипции гена RAD6 весьма умеренная, менее чем в два раза, и может объясняться влиянием УФ-лучей на клеточный цикл. Однако исследования на синхронных культурах показали значительное увеличение уровня транскрипции гена RAD6 при УФ-облучении - в 5-6 раз, причем нарастание происходило быстро, в течение 30 минут, а затем быстро падало до нормального уровня, не наблюдалось различий в зависимости от стадии клеточного цикла в отсутствие облучения.

Регуляция генов, принадлежащих к группе RAD6, участвующих в пострепликативной репарации и/или мутагенезе, неодинакова. В то время как для генов RAD6, RAD18 и RAD30 транскрипция четко индуцибельна, уровень транскрипции REV3 в лучшем случае на грани увеличения и нет никаких оснований для утверждения об индуцибельности REV1.

Уровень транскриптов, кодируемых генами RAD2 и RAD54, увеличивается в 6 раз после обработки различными агентами, повреждающими ДНК, включая некоторые из них, к которым мутанты не чувствительны (например, γ -лучи в случае мутанта *rad2* и УФ-облучение в случае мутанта *rad54*).

Транскрипция гена RAD54 индуцируется γ - и УФ-облучением, а также повреждениями нитей ДНК в результате сверхэкспрессии эндонуклеазы *EcoRI*. Максимум экспрессии наблюдается через 2-4 часа, и этот уровень поддерживается свыше 8 часов. Индукция происходит как в стационарных культурах, так и в растущих (в которых облучение вызывает арест на стадии G2), а также в синхронизированных α -фактором культурах. По-видимому, индукция не зависит

от стадии клеточного цикла. RAD54 и RAD52 (который не индуцируется повреждениями ДНК) также индуцируются в мейозе.

Несмотря на то, что индуцибельные гены одновременно активируются повреждениями ДНК, в их промоторной области не было обнаружено общего консенсуса, ответственного за индукцию. Однако делеционный анализ промоторных областей генов RAD2, RNR2 и RAD54 выявил последовательности, необходимые для их индукции. Эти элементы, ответственные за индукцию повреждениями ДНК (*DNA-damage elements - DRE*), включают DRE1 и DRE2 у гена RAD2, D1 и D2 у RNR2 и DRS у гена RAD54. В промоторной области гена MAG1 обнаружены активирующий сайт (UAS) и два репрессирующих сайта (URS). UAS локализован в кодирующей области другого индуцибельного гена DDI1. Ген DDI1 транскрибируется отдельно от MGA1 и корегулируется с MAG1 тандемным повтором (8 пар оснований), но имеет отдельный URS-элемент. В промоторной области гена SNM1 обнаружен мотив в 15 пар оснований, гомологичный DRE2-элементу в промоторной области гена RAD2, ответственный за индуцибельность гена SNM1.

В промоторной области гена RAD30 обнаружены последовательности, потенциально принадлежащие этой группе элементов. Идентифицировано 4 последовательности, аналогичные репрессорному элементу гена MAG1. Два элемента схожи с активаторными последовательностями в промоторах генов RAD23 и RAD2 (= DRE2). Некоторые характерные промоторные мотивы, отвечающие за индуцибельность различных дрожжевых генов, проявляют общие последовательности. Было продемонстрировано *in vitro* связывание с этими элементами белкового комплекса *Rpa* (связывающегося с однострессовой ДНК), специфичное к последовательности ДНК.

В случае гена RAD2 четыре чрезвычайно АТ-богатых трека АТ1-АТ4 необходимы для конститутивной экспрессии этого слабоэкспрессируемого гена. Делетирование этих элементов приводит к утрате УФ-индуцибельности и уменьшению конститутивной экспрессии. Обнаружено также 2 элемента, по-видимому, являющихся *cis*-активными областями для регуляции специфичной к повреждениям ДНК, DRE1 и DRE2. DRE1-элемент необходим для конститутивной и индуцибельной экспрессии. Делеция DRE2-элемента снимает индуцибельность, но не влияет на базовый уровень экспрессии гена. С регуляторными участками связываются белки, но образование этих комплексов ингибируется циклогексимином, таким образом, для индукции транскрипции гена RAD2 требуется синтез белков *de novo*. Скорее всего, увеличение экспрессии обусловлено увеличением синтеза белка, а не посттрансляционной модификацией - увеличением сродства белков к промоторным областям.

Делеционный анализ промотора гена RAD54 выявил позитивную регуляцию этого гена и дискретные элементы для индуцибельности повреждениями ДНК и конститутивной экспрессии, некоторые из которых отличались от таковых у гена RAD2. АТ-богатые области необходимы для конститутивной экспрессии RAD54,

и одна из них включает потенциальный сайт связывания белка датина. Найдена также последовательность DRS, ответственная за индуцибельность гена RAD54.

Аналогичные последовательности были идентифицированы в промоторных областях нескольких индуцибельных генов - RAD7, RAD23, PHR1, SNM1 и MAG1. Были обнаружены комплексы белок-ДНК сходной подвижности. Но сделать вывод об одном общем транскрипционном факторе пока нет оснований.

Одним из наиболее хорошо изученных индуцибельных генов является ген PHR1, кодирующий ДНК-фототиазу. Основным и индуцированным уровни экспрессии гена PHR1 зависят от некоторой последовательности UAS PHR1 (*upstream activation sequence*), гомологичной DRC-элементу *G/CGA/TGGA/CRRNANA/T*, найденному в 5'-фланкирующей области, по крайней мере 19 других генов (RAD2, RAD7, RAD16, RAD23, RAD53, MAG1), участвующих в репарации и метаболизме ДНК. В случае генов RAD2, RAD23, RAD53, MAG1 и PHR1 продемонстрировано участие этих элементов в регуляции транскрипции. Показано, что репликативный белок A (RP-A), связывающийся с однострессовой ДНК, *in vitro* связывает олигонуклеотиды, содержащие аналогичные элементы генов RAD1, RAD2, RAD4, RAD10, RAD16, RAD51, RNR2, RNR3, PHR1, DDR48, MGT и MAG. Однако *in vivo* роль белка RP-A в регуляции транскрипции этих генов не установлена. Обнаружен ген UME6, являющийся регулятором UAS-активности гена PHR1. *Ume6p*, помимо UAS PHR1, связывается с DRC-элементами генов RAD2, RAD7, RAD53. По-видимому, UME6 принимает участие в регуляции экспрессии серии генов, индуцибельных повреждениями ДНК. Делетирование этого гена приводит к повышению УФ-чувствительности мутантов *rad2*.

В случае PHR1 обнаружено, что репрессорный белок связывается с участком длиной 39 bp в положении -40, включающим палиндром. Связывающая активность не обнаружена во фракционированном экстракте УФ-облученных клеток. Более того, делетирование этого участка приводит к увеличению конститутивной экспрессии и уменьшению индуцибельности. Вставка этой последовательности в гетерологичный нерегулируемый промотор приводит к репрессии конститутивной экспрессии и индуцибельности УФ-лучами.

Однако биологическое значение индукции генов RAD2 и RAD54 неизвестно. Были сделаны конструкции, в которых эти гены находились под контролем промоторов с делетированной частью, ответственной за индукцию. Дефектность индуцибельности RAD54 не приводила к повышению γ -чувствительности или чувствительности к MMS у гаплоидных или диплоидных клеток. Без изменения оставались также споруляция, рекомбинация и переключение типа спаривания. Аналогичный негативный результат был получен и для гена RAD2. Делетирование промоторного DRE-элемента гена RAD2, которое снижает индукцию УФ-лучами, имеет умеренный эффект на выживаемость. Причем этот эффект детектируется только тогда, когда клетки синхронизированы и облучаются в фазе G1.

Таким образом, идентифицировано большое количество генов, транскрипция которых увеличивается после обработки клеток повреждающими агентами. Схема индукции или промоторные структуры не обнаруживают общих черт или сигнальной системы, и биологическое значение экспрессии после повреждения ДНК пока не доказано.

Среди множества индуцибельных генов помимо репарационных генов есть и *checkpoint*-гены. Можно предположить, что увеличение экспрессии генов приводит к увеличению способности клеток к репарации повреждений.

Checkpoint-белки могут иметь более прямую роль в репарации, хотя эта роль пока еще мало изучена. Взаимосвязь *checkpoint*-контроля с репарационными путями и белками остается главной областью исследований. *Checkpoint*-белки, по-видимому, не имеют существенной роли в основных путях репарации. Многие репарационные гены не имеют дефектов по остановке клеточного цикла. Действительно ли *checkpoint*-белки имеют прямую роль в минорных путях репарации, еще менее ясно. Возможно, *checkpoint*-белки участвуют в переброске репарационных белков от теломеры (кэппирование концов хромосомы) к местам повреждений.

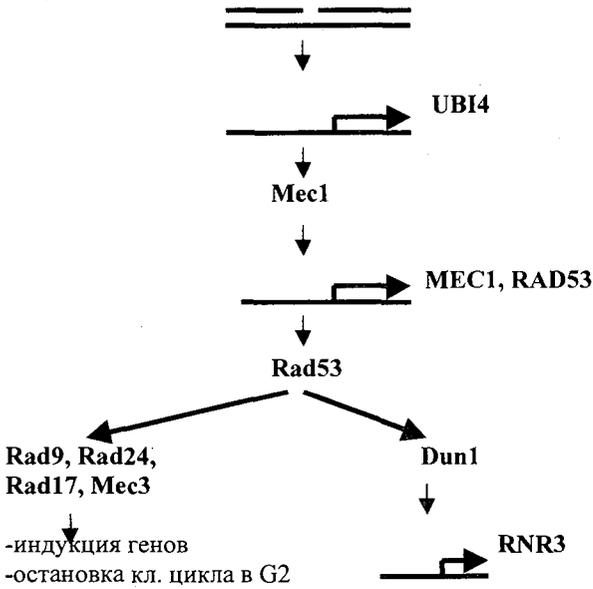
В индукции транскрипции некоторых генов принимают участие некоторые *checkpoint*-гены, в том числе гены MEC1, RAD53 и DUN1, которые, вероятно, регулируют множество транскрипционных факторов. Кроме того, показано, что протеинкиназа *Hrr25* связывается с фосфорилированным транскрипционным фактором SWI6, участвующим в транскрипции некоторых индуцибельных генов. SWI6 также является мишенью, участвующей в *G1/S*-остановке.

Участие *checkpoint*-регуляции в индукции генов повреждениями ДНК представляет большой интерес, так как в присутствии неполностью реплицированной (*S-phase checkpoint*) ДНК или поврежденной (*G1*- и *G2-checkpoint*) было бы желательно не только остановить прохождение клеточного цикла, но и увеличить репликативную способность клетки. Дрожжевая ДНК-полимераза ζ , идентичная *Dun2*, по-видимому, является сенсором завершения репликации ДНК и, возможно, включает *Sad1/Rad53*-путь.

К идентификации первых путей индуцибельности транскрипции привело открытие генов DUN1, DUN2/POL2 и SAD1. Большинство известных индуцибельных генов регулируются различными повреждающими агентами и, по-видимому, корегулируются генами клеточной *checkpoint*-регуляции. Показано, что активация транскрипции нескольких генов рибонуклеотидредуктаз (RNR) контролируется протеинкиназой *Dun1*, которая, в свою очередь, регулируется протеинкиназой *Sad1/Rad53*. Однако другие индуцибельные гены, такие как DDR48, UB14 и RAD54, регулируются независимо, что предполагает существование нескольких путей. Активация протеинкиназы *Dun1* зависит от гена SAD1, а активация генов SNM1, RAD2, RAD54 не зависит от гена SAD1.

Отметим, что обработка циклогексимидом приводит к различной экспрессии генов в ответ на повреждения ДНК. Например, в отсутствие белкового синтеза *de novo* базовый уровень снижен, а MMS-индукция транскрипции гена MAG1

а) Первоначальное повреждение ДНК (УФ, ММС)



б)

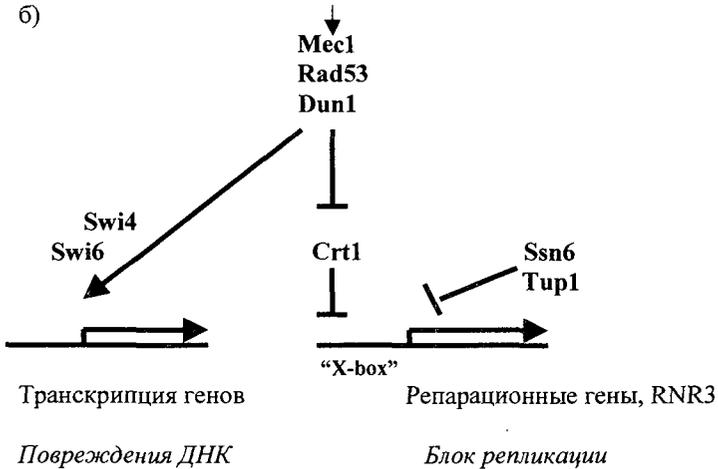


Рис. 11. Регуляция транскрипции индуцибельных генов

подавлена; базовый уровень транскрипции гена *DDI1* повышен, тем не менее *MMS*-индуцибельность отсутствует; базовый уровень экспрессии гена *RAD2* увеличен, а уровень экспрессии гена *RNR2* не изменяется. Эти наблюдения показывают существование множественных путей ответа на повреждения у дрожжей.

Хотя механизм остановки клеточного цикла и индукции транскрипции повреждениями ДНК у эукариот недостаточно изучен, у бактерий аналогичная реакция клетки, названная *SOS*-ответом, изучена более подробно. У бактерий для транскрипционного ответа и остановки клеточного цикла, связанных механически, требуется белок *recA*. Транскрипционный ответ (*recA*-зависимый, транскрипционная дерепрессия ингибитора) является результатом ареста поврежденной клетки. У эукариотических клеток специальные гены также опосредуют как транскрипционный ответ, так и остановку (*p53* - у клеток млекопитающих, *MEC1* и *RAD53* - у дрожжей). Однако два ответа не являются связанными. По крайней мере для *G2-checkpoint* у дрожжей транскрипционная индукция не требуется для ареста после повреждения ДНК, арест возможен в присутствии циклогексимида, ингибитора синтеза ДНК. Анализ индуцибельности самих *checkpoint*-генов показал, что количество транскриптов генов *MEC1*, *RAD53*, *RAD17* и *RAD24* увеличивается при УФ-облучении, в отличие от гена *RAD9*. Ранее было показано, что транскрипция гена *RAD9* не увеличивается и при γ -облучении. Только *RAD53* содержит идентифицированный элемент *DRE*.

Показано, что ген *MEC1* опосредует три транскрипционных пути, *RAD53* нужен для двух из них, а *RAD17* опосредует только один путь (рис. 11а). После облучения индукция транскрипции некоторых генов, например *UBI4*, происходит независимо от *checkpoint*-белков. Ген *MEC1* необходим для индукции транскрипции трех классов генов - класс А (*MEC1*, *RAD53*), класс В (*RNR3*) и класс С (*DDR48*). Ген *RAD53* необходим для индукции генов классов В и С. В клетках, обработанных *HU*, ген *RAD17* необходим для индукции транскрипции гена *DDR48*, но не для остановки клеточного цикла. Можно предположить, что в *S*-фазе арест и индукция транскрипции гена *DDR48* активируются различными повреждениями. Поскольку ген *RAD17* кодирует экзонуклеазу, можно предположить, что для индукции транскрипции необходима деградация повреждения, а для ареста - нет. Арест и индукция транскрипции генов класса В (как *RNR3*) после обработки *HU* также требуют гена *POL2*. Наблюдается увеличение транскрипции одного из *DDR*-генов в присутствии мутации *rad52*, вызывающей нарушение репарации разрывов ДНК, в отсутствие облучения.

Показано, что *Ctrl* является корепрессором транскрипции и эффектором *checkpoint*-путей. Мутант *ctrl* характеризуется конститутивной транскрипцией *RNR3* (рис. 11б). В нормально реплицирующихся клетках *Ctrl* функционирует совместно с *Ssn6* и *Tup1* в репрессии генной транскрипции, показано их сщепление *in vitro*. *Ctrl* репрессирует транскрипцию, связываясь с цис-активной последовательностью ДНК длиной 13-bp, называемой "*X-box*". Эта последовательность аналогична последовательности, узнаваемой *RFX* - белками

млекопитающих, регулирующими транскрипцию генов МНСII-класса. Аналогичные последовательности обнаружены у некоторых репарационных генов дрожжей. После блока репликации ДНК *Mec1*, *Rad53* и *Dun1* необходимы для фосфорилирования *Ctrl*, которое вызывает диссоциацию *Ctrl* с последовательностью "X-box", приводящую к дерепрессии транскрипции. Индукция транскрипции репарационных генов после повреждения ДНК осуществляется другим путем, который включает транскрипционные регуляторы *Swi4* и *Swi6*.

АДАПТАЦИЯ

Клетки дрожжей с нерепарируемыми повреждениями ДНК останавливаются на продолжительное время, до 10 часов (5 генераций), и возобновляют митоз, по-видимому, без репарации повреждений ДНК. Прохождение клеточного цикла без репарации называют "адаптацией", в противоположность прохождению клеточного цикла с репарацией, которое называют "восстановлением". Мутанты дрожжей, утратившие способность к адаптации (например, поврежденные мутантные по адаптации клетки остаются арестованными сверх 10 часов), идентифицированы и включают аллель ПК CDC5, известную по другому контексту - участию в регуляции митоза. Адаптация важна, так как нормальные клетки с нерепарируемыми повреждениями (или дефектом репарации) могут, через адаптацию, проявлять *checkpoint*-подобный фенотип и, следовательно, генетическую нестабильность.

Рукопись поступила в издательский отдел
20 февраля 2001 года.