

## ОБЩАЯ СХЕМА “ЧЕКПОЙНТА”

Молекулярные механизмы остановки клеточного цикла несколько отличаются в зависимости от типа повреждения и фазы клеточного цикла. Остановки могут происходить в разных фазах клеточного цикла, соответственно они будут называться, например  $G_1/S$ -,  $S$ - или  $G_2/M$ -“чекпойнты”. Причины остановок могут быть разные, например повреждения ДНК, блок репликации или другие нарушения прохождения клеточного цикла. Наиболее хорошо изучены остановки клеточного цикла, индуцируемые повреждениями ДНК или блоком репликации (см. рисунок). Сигналом для индукции “чекпойнта” служит

устойчиво сохраняющаяся однонитевая ДНК (онДНК) [11, 12]. Первичные повреждения ДНК, процессинг которых приводит к образованию участка онДНК, также индуцируют “чекпойнт”. Так, индукция последнего 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 [13]. 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. Индукция “чекпойнта” ДНР ДНК происходит

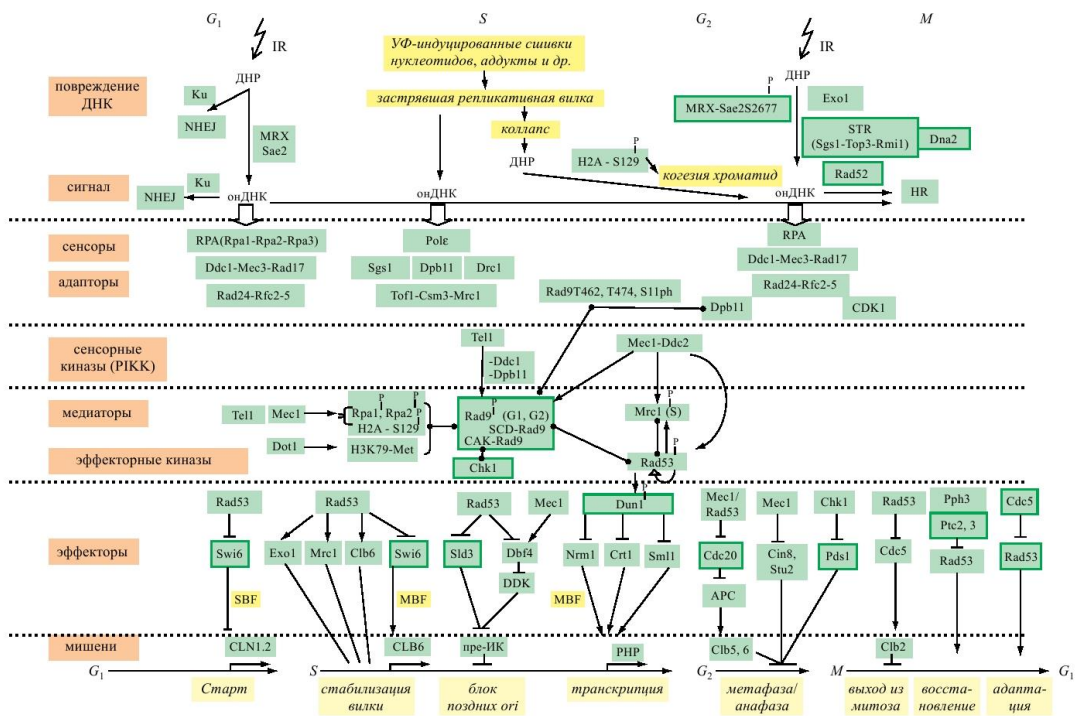


Схема “чекпойнта”, индуцируемого репликативным стрессом и повреждениями ДНК. CDK1 регулирует активность многочисленных белков “чекпойнта” при индукции повреждений ДНК (субстраты CDK1 выделены рамкой). В случае повреждения ДНК или репликативного стресса сенсоры активируют сенсорные киназы Mec1 и Tel1. Активация эффекторных киназ (Rad53, Dun1 и Chk1) опосредуется двумя медиаторами – Rad9 и Mrc1. Если Mrc1 функционирует в качестве медиатора в процессе репликации ДНК, то Rad9 может узнавать повреждения, которые возникают вне  $S$ -фазы. Медиатор Rad9 (или Mrc1) 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 нарушений. 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 медиатор Rad9, усиливая сигнальный каскад, или киназу Rad53, фосфорилирование которой имеет значение не в активации, а в предотвращении адаптации.

в результате процессинга ДНР экзонуклеазным комплексом MRX (Mre11-Rad50-Xrs2)-Sae2 (у человека hNBS1-RBBP8 или hNBN-CTIP), расщепляющим 5'-нить с образованием короткого (~100 н.) 3'-конца онДНК [14]. Индукция “чекпойнта” происходит также при накоплении онДНК в теломерах у мутанта *cdc13-1* и при инактивации ДНК-лигазы Cdc9.

$G_1/S$ - и  $G_2/M$ -“чекпойнты”. Сенсоры, узнающие повреждения, вызванные УФ-светом, ионизирующей радиацией (ИР) и ДНР эндогенного происхождения, индуцируют остановку на Границе  $G_1/S$ - и  $G_2/M$ -фаз клеточного цикла. Образовавшиеся участки онДНК узнаются несколькими белковыми комплексами (см. рисунок), такими как RPA (*replication protein A*), Rad24-RFC и Ddc1-Mec3-Rad17 [15]. Прежде всего, участки онДНК покрываются гетеротримером RPA (Rpa1-Rpa2-Rpa3). К границе между RPA-онДНК и дуплексом ДНК доставляется гетеротример Ddc1-Mec3-Rad17 [16] (у человека ортологи hRad9, hHus1, hRad1), проявляющий сходство со скрепкой или репликативным фактором процессивности гомотримером PCNA (у Pol30). В процессе репликации доставка скрепки PCNA к границе 3'-онДНК/днДНК осуществляется гетеропентамерным комплексом RFC (*replication factor C*). К сайту повреждения ДНК комплекс Ddc1-Mec3-Rad17 доставляется 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 [17]. К сенсорным киназам, связывающимся с повреждениями ДНК, относятся киназы Mec1 и Tel1, ортологи PIKK (*phosphatidylinositol 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 связывается с поврежденным хроматином посредством белка Ddc2, который взаимодействует как с ДНК, так и с RPA-онДНК [18, 19]. Связывание Mec1-Ddc2 с RPA приводит к активации киназы. При этом две субъединицы Mec1 фосфорилируют друг друга. Комплекс разрушается, высвобождая активную форму киназы Mec1, которая взаимодействует с субстратами [20, 21]. Отметим, что комплекс Rad24-RFC необходим только для доставки Ddc1-Mec3-Rad17 к повреждению ДНК и не нужен для индукции “чекпойнта”, если комплекс с Mec1-Ddc2 уже образовался. Сайт повреждения ДНК, по-видимому, служит платформой для концентрации адапторных молекул. Протомер Ddc1

комплекса Ddc1-Mec3-Rad17 увеличивает киназную активность Mec1 как напрямую, так и привлекая второй активатор Mec1 – белок Dpb11 [22–24].

Однако для последующей активации эффекторной киназы Rad53 недостаточно колокализации комплексов Mec1-Ddc2 и Ddc1-Mec3-Rad17, а дополнительно необходим медиатор Rad9. Доставку Rad9 осуществляет комплекс (Ddc1-Mec3-Rad17)-Dpb11 [25, 26]. Кроме того, для эффективного связывания Rad9 (ортолог у человека 53BP1) необходимы, по крайней мере, две модификации гистонов – фосфорилирование H2A и метилирование H3(H4) [27, 28]. В ответ на повреждение ДНК активные киназы Mec1 или Tel1 быстро фосфорилируют две субъединицы RPA (Rpa1 и Rpa2) и C-концы гистонов H2A вокруг ДНР [29, 30]. Гистон H2A фосфорилируется по серину 129 (H2AS129ph) на расстоянии ~50 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) по обе стороны от повреждения [31]. Эта модификация обеспечивает взаимодействие с Rad9. Аналогично у позвоночных 53BP1 ассоциирует с вариантом гистона H2A (H2AXS139ph) после его фосфорилирования киназами ATM или ATR [32, 33]. Кроме того, конститутивное метилирование лизина 79 гистона H3 (H3K79me) метилтрансферазой Dot1 опосредует взаимодействие ДНК с Tudor-доменом Rad9 [27, 34]. Так как в ответ на повреждение ДНК метилирование гистона H3 не изменяется, предполагается, что связывание белков “чекпойнта” с модифицированным гистоном становится возможным в результате локального изменения структуры хроматина, вызванного возникновением ДНР [27]. Аналогично метилирование лизина 20 гистона H4 (H4K20me) необходимо для поддержания 53BP1 [35]. При наличии двух меток белок Rad9 связывается с хроматином [36] 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. Предполагается, что хроматин выступает не только в качестве платформы для сборки адапторных молекул вблизи сенсорных киназ. Локальные изменения хроматина, вызванные повреждением ДНК, способствуют поддержанию компонентов “чекпойнта” в районе повреждения [28].

В дальнейшем фосфорилирование адаптора Rad9 сенсорной киназой Mec1 обеспечивает активацию и олигомеризацию Rad9. Индуцированное повреждениями ДНК фосфорилирование Rad9 коррелирует с перестройкой Rad9-комплекса (~850 кДа) в меньший по размеру комплекс (560 кДа), содержащий индуцированную повреждениями ДНК гиперфосфорилированную форму Rad9 [37, 38]. Эта форма позволяет Rad9 осуществлять функцию адаптора для активации киназы

Rad53 [39]. Rad53 связывается с фосфорилированным Rad9 через домены FHA (*forkhead homology associated*), ответственные за взаимодействие между фосфорилированными белками [40, 41]. Это связывание подготавливает Rad53 к фосфорилированию киназой Mec1 [42]. Для полной активации Rad53 необходимо дополнительное автофосфорилирование [38, 43], которое катализируется повышением локальной концентрации Rad53 на Rad9-платформе [39].

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 критичен для приема сигнала “чекпойнта”, индуцированного 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 [44], в том числе с фосфатазами Ptc2 и Ptc3, участвующими в ингибировании киназы Rad53 [45].

Активированный Rad53 покидает сайт повреждения и фосфорилирует эффекторы “чекпойнта”, участвует в регуляции транскрипции и остановке клеточного цикла (см. рисунок). К идентифицированным мишеням Rad53 относятся транскрипционный регулятор Swi6, а также киназы Dun1 и Dbf4. Фосфорилирование этих мишеней ведет к подавлению G1-циклинов, разрушению ингибитора рибонуклеотидредуктазы Sml1 и блокированию “открывания” поздних сайтов начала репликации *ori*. Rad53 участвует в стабилизации белковых комплексов в репликативной вилке, в регуляции транскрипции и, в частности, уровня синтеза гистонов [46].

Известны две сенсорные киназы. Большая часть Rad53-зависимого ответа у дрожжей определяется киназой Mec1 [47, 48]. Вторая 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 [49, 50]. Киназа Tel1 активирует киназу Rad53 в специфических условиях [51–53]. Кроме того, существуют две эффекторные киназы, осуществляющие остановки клеточного цикла, вызванные повреждениями ДНК. Один путь – Rad53-зависимый, второй контролируется киназой Chk1. Фосфорилирование Chk1 также зависит от Rad9 [54–56].

*Intra S-“чекпойнт”*. Особая ситуация складывается при репликации ДНК. Репликативный стресс могут вызвать многие внешние факторы, включая повреждение матрицы ДНК, снижение пула дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в результате ингибирования гидроксимочевинной (ГМ) биосинтеза дНТФ или остановки машины репликации ДНК-связывающими белками. Сигналом, активирующим “чекпойнт” в S-фазе, служит остановка движения репликативной вилки [57]. Сенсорами выступают репликативная полимеразы Pole и взаимодействующие с ней белки Dpb11 и Dgc1, 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 [58]. В отношении активации Rad53 в присутствии ГМ она принадлежит к той же эпистатической группе, что и Pole, и этот сигнальный путь действует параллельно Rad17 и Rad24 [59]. Однако не ясно, действительно ли S-специфические сенсоры Pole 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 TLS (*translesion synthesis*)-полимеразы, способными осуществлять синтез ДНК через повреждения [60]. В то же время полиубиквитинирование того же сайта PCNA комплексом Rad5-Ubc13-Mms2 активирует безошибочный путь переключения репликации на неповрежденную нить хроматина.

Репликативный “чекпойнт” в основном использует те же самые белки, что и “чекпойнт”, индукция которого осуществляется повреждениями ДНК. Главное различие заключается в использовании разных медиаторов. В репликативном “чекпойнте” вместо Rad9 в качестве медиатора выступает гетеротриммер 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 [61]. Эти белки взаимодействуют с репликативными комплексами GINS, MCM, Cdc45, Pole [62]. 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 вместе с ней в процессе репликации [63, 64], то он не нуждается в специальной доставке к “застывшей” вилке. Однако в определенных хромосомных сайтах, в которых негистоновые белки тесно связаны с ДНК, для

соответствующего ареста необходимы Tof1 и Csm3, а не Mrc1 [65].

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: реплисома Pole/Mrc1 узнает повреждение; к остановившейся вилке доставляется киназа Msc1, вероятно, посредством взаимодействия с участками онДНК, покрытыми комплексами RPA [64, 66]. Оба канонических активатора киназы Msc1 – Ddc1 и Dpb11 – могут участвовать в репликативном “чекпойнте” [67], хотя не ясно, действительно ли они абсолютно необходимы [24, 68]. В заблокированной повреждением репликативной вилке киназа Msc1 фосфорилирует медиатор Mrc1 [64], который содержит 17 SQ/TQ-сайтов фосфорилирования киназой Msc1. По-видимому, изменение конформации Mrc1 влияет на взаимодействие с компонентами реплисомы. Показано, что фосфорилирование Mrc1 приводит к высвобождению N-конца большой субъединицы Pole (Pol2), но взаимодействие между Mrc1ph и C-концом Pol2 сохраняется [69]. Белки Mrc1 и Msc1 необходимы для удержания полимераз Pole и Pol $\alpha$  в вилке [70–72]. Белок Mrc1 ингибирует отсоединение репликативной геликазы Msm2–7 от полимеразы на лидирующей нити и блокирует распад двух половинок реплисомы в “застывшей” вилке [62]. Таким образом, фосфорилированный медиатор Mrc1 стабилизирует остановившуюся на повреждении реплисому, которая остается связанной с вилкой, и удерживает в ней киназу Msc1.

Это взаимодействие создает платформу для последующих событий “чекпойнта”, включая доставку и фосфорилирование Rad53. Совместная локализация Msc1 и Mrc1 достаточна для доставки, фосфорилирования и активации Rad53 [73]. Mrc1 фосфорилируется не только киназой Msc1, но и Rad53 [63]. Существует несколько механизмов стабилизации комплексов в вилке. Msc1 и Rad53 могут функционировать на разных путях стабилизации. Киназа Rad53, по-видимому, является основным участником стабилизации комплексов в вилке. Активация Rad53 и дополнительное фосфорилирование медиатора Mrc1 позволяют удерживать реплисому в репликативной вилке до тех пор, пока репликация не возобновится. Rad53 стабилизирует остановившуюся вилку, частично блокируя активность Eho1 [74]. Rad53 имеет также Eho1-независимую функцию [75]. В отсутствие Rad53 в стабилизации вилки принимает участие киназа Chk1 [74].

В S-фазе клеточного цикла фосфорилированные гистоны H2AS129ph играют дополнительную роль в сборке когезиновых комплексов в сайте

ДНР. В норме когезиновый комплекс скрепляет сестринские хроматиды в местах, разделенных расстоянием около 10–15 т.п.н. Когда в одной из хроматид появляется ДНР, с обеих сторон ДНР собирается множество когезиновых комплексов, связывающих разорванную и нативную хроматиды. При этом фосфорилированный гистон H2AS129ph участвует в связывании с сайтом ДНР специализированных белков (Csm3, Tof1, Mrc1, Rad9, Ddc1), участвующих в когезии хроматид [76]. 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 [77].

### АКТИВАЦИЯ “ЧЕКПОЙНТА”

Дрожжевая клетка с повреждением, индуцированным в фазе  $G_1$ , характеризуется задержкой вступления в фазу S на 20–30 мин. У дрожжей остановка на границе фаз  $G_1/S$ , по-видимому, обеспечивает время для репарации [78], а у млекопитающих – для запуска апоптоза. Эта задержка значительно короче, чем опосредованная  $G_2/M$ -“чекпойнтом” остановка продолжительностью до 8 ч. Так, при индукции HO-эндонуклеазой единичного ДНР происходила Msc1-зависимая короткая задержка в  $G_1$  (15 мин) и длительная задержка в  $G_2$ -фазе перед анафазой (8–12 ч), но не наблюдали задержку в фазе S или активацию S-“чекпойнта” [79]. Возможно, эта разница связана с тем, что в  $G_2/M$  доступен более широкий спектр типов репарации, в том числе межхроматидный обмен. В  $G_1$ -фазе репарация ДНР осуществляется по механизму NHEJ (*nonhomologous end joining*), не требующему протяженных участков онДНК, а следовательно, и интенсивной деградации ДНК.

Ответ клетки различается в зависимости от типа разрыва ДНК, полученного в фазе  $G_1$ . 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 [80]. 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-белков 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. С комплексом MRX за онДНК конкурируют белки RPA, которые связываются с онДНК длинных, процессирующихся концов, и индуцируют “чекпойнт”. Если размер деградации концов ДНР превышает четыре нуклеотида, то для репарации будут потребованы ферменты HR.

В  $G_1$ -фазе 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. HO-эндонуклеаза при рестрикции образует короткие (4 н.) 3'-перекрывающиеся концы, однако потом происходит 5'-деградация сначала комплексом MRX-Sae2 и затем более протяженная экзонуклеазой Exo1 или геликазой STR (Sgs1-Top3-Rmi1), сцепленной с нуклеазой Dna2.

Последующие после процессинга стадии HR, связанные с Rad52, ингибированы в  $G_1$ . Доставка Rad52 к месту повреждения осуществляется только после вступления в фазу S [81]. Активация HR происходит позже в процессе клеточного цикла в результате фосфорилирования Rad52 киназой CDK1. Rad52 конститутивно фосфорилирован по нескольким сайтам сериновых и треониновых остатков. При вступлении в фазу S происходит дополнительное фосфорилирование. Фосфорилируется С-конец Rad52, хотя какие именно конкретные остатки фосфорилируются, не известно. Также предстоит выяснить роль этого фосфорилирования. После повреждения ДНК дополнительного фосфорилирования не происходит. Причем фосфорилирование Rad52 не зависит от киназ Mec1 и Tel1, что подчеркивает его независимость от повреждения ДНК. Активность киназы CDK1 необходима для доставки Rad52 в фокусы [82]. Однако не ясно, действительно ли CDK1 напрямую ответственна за фосфорилирование, регулируемое клеточным циклом [83]. Хотя разрушение активаторов CDK1-циклинов S-фазы Clb5 и Clb6 замедляет доставку к повреждению ДНК белка Rad52, 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 генотоксический стресс [84, 85]. Таким образом, протяженная деградация ДНК и доставка Rad52 инициируются на стадии  $G_1/S$  и регулируются киназой CDK1. Можно предположить, что в ответ на повреждение ДНК происходит перераспределение Rad52 из диффузного ядерного состояния в отдельные “фокусы” в сайтах ДНР. Предполагается, что

начальный уровень фосфорилирования, обнаруживаемый при прохождении клеточного цикла, подавляет, а клеточно-зависимое фосфорилирование стимулирует своевременное образование Rad52-фокусов для HR.

Фазы  $G_1$  и  $G_2$  отличаются не только механизмами репарации ДНР, но и механизмами индукции остановки. Индукция “чекпойнта” ДНР в фазе  $G_1$  не нуждается в CDK1 [86], имеющей в этой фазе низкую активность. Однако в фазах  $G_2/M$  эффективное формирование сигнала “чекпойнта” нуждается в активности CDK1, и частично это связано с участием CDK1 в процессинге ДНР [83–86]. CDK1 фосфорилирует остаток S267 нуклеазы Sae2, формирующей участок онДНК [90] и необходимой для индукции “чекпойнта” [86]. Второй мишенью киназы CDK1 является нуклеаза Dna2, фосфорилирование которой обеспечивает ее доставку в ядро [91]. Нуклеаза Sae2 образует короткие участки онДНК, для формирования более протяженных фрагментов требуется участие нуклеаз Dna2 и Exo1, комплекса MRX и геликазы Sgs1.

Хотя деградация ДНК играет важную роль в усилении сигнала, было показано, что CDK1 необходима также для последующих шагов доставки сенсоров и адапторов. Для эффективной передачи сигнала “чекпойнта” необходимы PCNA-подобная скрепка Ddc1-Mec3-Rad17 и киназа Mec1-Ddc2. Для их мобилизации и удержания в сайте повреждения необходим RPA. Было показано, что в асинхронных культурах они связываются с RPA независимо друг от друга [92–95], необходимы и достаточны для индукции “чекпойнта” [96]. Однако в  $G_1$  доставку Mec1-Ddc2 к ДНР предваряет связывание скрепки Ddc1-Mec3-Rad17 с RPA [97]. В фазах S/ $G_2$  для доставки Mec1-Ddc2 дополнительно требуется активная киназа CDK1 [93]. При индукции “чекпойнта” в S/ $G_2$ -фазах наблюдается кооперация комплексов CDK1, Ddc1-Mec3-Rad17 и RPA. Анализ гибели клеток при воздействии 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* [98].

Кроме того, CDK1 играет важную роль в формировании Rad9 в качестве медиатора “чекпойнта” при индукции повреждений ДНК. Rad9 содержит девять 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* [100, 101, 56]. У *S. pombe* наблюдается аналогичная картина. BRCT-содержащий “чекпойнтный” белок Crb2 (ортолог Rad9) подвергается

фосфорилированию киназой CDC2 [102–104], и эта модификация важна для локализации Crb2 [103]. Предполагается, что фосфорилирование необходимо для адаптации “чекпойнта” и репарации [102, 104].

Активация Rad9 включает много этапов, в том числе доставку Rad9 к повреждению ДНК, изменение статуса олигомеризации, фосфорилирование киназой Mec1/Tel1, связывание и активацию Rad53 [105, 41, 38]. Мутационные замены 18-ти CDK1-сайтов в белке Rad9 вызывают утрату адапторной функции и неспособность активировать киназу Rad53 [96]. Показано, что сайты фосфорилирования Rad9 участвуют во взаимодействии с белком Dpb11, который доставляется комплексом Ddc1-Mec3-Rad17 [25]. Rad9 взаимодействует с Dpb11 либо напрямую посредством T462ph и T474ph [106], либо косвенно посредством S11ph [107]. Взаимодействие Dpb11 с Rad9Ser11ph обнаруживается только при повреждении 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) [108]. Этот фрагмент обозначили как CAD (*Chk1 activation domain*). Сайты CDK1–9 специфичны в отношении второй эффекторной киназы Chk1 “чекпойнта” при повреждениях ДНК и необходимы для ее активации и поддержания в ответ на действие различных типов ДНК-тропных агентов. Напомним, что остановку в  $G_2/M$ -фазах осуществляют два аддитивных пути, зависящих от эффекторных киназ Rad53 и Chk1 [109, 110]. Возможно, аддитивность взаимодействия CDC28 с RAD53 при воздействии ИР [98] объясняется необходимостью участия киназы CDK1 в активации киназы CHK1.

Отметим, что медиатор Rad9 подвергается CDK1-зависимому фосфорилированию в процессе клеточного цикла в отсутствие повреждений ДНК [102, 111, 112]. При этом, по мере прохождения клеточного цикла через  $S$ ,  $G_2$  и  $M$  уровень фосфорилирования 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) [102, 111–113].

Предполагается, что существует динамическая ассоциация Rad9 и Chk1 с хроматином, даже в отсутствие повреждений ДНК [107, 114, 115]. В фазах  $G_1$  и  $S/G_2$  взаимодействие Rad9 с Chk1 не зависит от повреждений ДНК и активности CDK1, хотя в  $G_2/M$  взаимодействие между ними полностью зависит от CAD-Rad9 и активности CDK1. В  $G_2/M$ -фазе киназа CDK1 фосфорилирует CAD-Rad9 и активирует киназу Chk1, взаимодействующую с этим фрагментом.

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 вместе с другими комплексами Rad9 доставляется к сайту повреждения ДНК, где Rad9 переходит из С- 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. Связь Chk1 с Rad9 контролируется обратимым статусом фосфорилирования остатков T125 и T143 [116, 117]. Сочетание стимулирующего фосфорилирования T143ph и низкого ингибирующего уровня T125ph способствует взаимодействию Rad9-Chk1 в проксимальной от повреждения области, где киназа Chk1 может фосфорилировать локальные мишени. Дефосфорилирование T143 и фосфорилирование T125, предположительно, дестабилизируют взаимодействие Rad9-Chk1 и ограничивают базовый пул Rad9, способный взаимодействовать с Chk1 [118].

Таким образом, фосфорилирование Rad9 происходит как при повреждении ДНК, так и в отсутствие повреждения в фазах  $G_2/M$ , когда активность CDK1 наиболее высока. Для активации Rad9 в  $G_1$ , когда Rad9 имеет низкий уровень CDK1-фосфорилирования, приобретает более важное значение структура хроматина, фосфорилирование H2AX и метилирование H3K79 [36, 119, 120]. В сайте повреждения ДНК активированная киназа Mec1 осуществляет фосфорилирование и ремоделирование обоих белков Rad9 [37] и Chk1 [117]. Далее происходит *цис*-автофосфорилирование Chk1 [121] и последующее высвобождение из комплекса D-Rad9-Chk1, локализованного на поврежденном хроматине. Отметим, что активация 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 [39]. Кроме того, в отличие от Chk1 высвобождение активной киназы Rad53 от Rad9 происходит АТФ-зависимым способом [38].

## СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Вклад киназы CDK1/CDC28 в регуляцию клеточного цикла посредством химической модификации хромосом мало изучен. К самым известным субстратам киназы относится линкерный гистон H1. Как следует из названия, он располагается в линкерных участках ДНК и связывает соседние нуклеосомы. Структура хроматина у дрожжей менее конденсированная и линкерный участок короче, чем у млекопитающих (165 против 205 п.н.).

Дрожжи имеют один гистон H1, а у млекопитающих найдено пять 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-го потенциального сайта фосфорилирования шесть сайтов фосфорилируются киназой CDK1 [122, 123]. У млекопитающих деконденсирующее фосфорилирование гистона обнаружено в процессе транскрипции генов и при инициации репликации [124]. У дрожжей линкерный гистон H1 также участвует в регуляции транскрипции [125], HR-репарации [126], формировании хроматина структуры высокого порядка [127]. Линкерный гистон взаимодействует с коровым гистоном H4 [125] и компонентом Apr4 трех АТФ-зависимых ремоделирующих хроматин комплексов (ремоделеры) INO80, SWR1, NuA4 [128]. Ремоделеры INO80, RSC, SWR1 участвуют в начальной стадии процессинга концов ДНР.

С другой стороны, субъединицы ремоделеров также являются субстратами киназы CDK1. Ремоделеры принимают участие в узнавании и расчистке ДНК от нуклеосом в процессе репарации. Показано, что субстратом CDK1 является гомодимерный АТФ-зависимый ремоделер Fun30 [129], входящий в SNF2-семейство и отвечающий за сайленсинг гетерохроматина. Показано, что Fun30 (hSMARCD1) принимает участие в протяженной деградации 5'-нити ДНР [130], а ингибирование киназной активности CDK1 блокирует доставку Fun30 к ДНР.

Негативный регулятор Sip2 киназы Snf1 (ремоделер SWI/SNF) также относится к субстратам CDK1 [83]. Известно, что предшествующее фосфорилирование белка может облегчить последующую химическую модификацию. Так, фосфорилирование H3 по Ser10 киназой Snf1 облегчает дальнейшее ацетилирование Lys14 ацетилазой Gcn5 (ремоделер SAGA) [131, 132]. Выявлено генетическое взаимодействие между генами *CDC28* и *HFI1* (компонент SAGA), двойная мутация *cdc28-srm hfi1-srm* образует синтетическую леталь [133]. Кроме того, субстратами киназы CDC28 являются белки Ngg1 (компонент SAGA) и Spt16 [83]. Белок Spt16 является транскрипционным фактором элонгации и связывается с НАТ-комплексом NuA3 [134]. Таким образом, вопрос о влиянии киназы CDC28 на структуру хроматина закономерен и нуждается в дальнейшем изучении.

#### ФАЗА $G_1/S$

Хотя в индукции “чекпойнта” повреждением ДНК в фазе  $G_1$  киназа CDK1 не участвует, наблюдается влияние мутации каталитической субъединицы киназы на остановку клеточного цикла

в культурах, синхронизованных половым гормоном в фазе  $G_1$  [135]. Так, у мутантов *cdc28-srm* наблюдалось снижение задержки клеточного цикла в  $G_0$  (с 50 мин у *CDC28* до 18 мин у *cdc28-srm*) и  $G_1$  (с 11 до 0 мин) после воздействия УФ-света. К сожалению, у мутанта *cdc28-srm* не определяли киназную активность комплексов CDK1. В то же время у мутантов *cdc28-5M* выявлено не только влияние мутации на остановку, вызванную УФ-повреждениями, но и снижение киназной активности, ассоциированной с циклинами Clb5 и Clb6 [136]. В мутантных клетках *cdc28-as1*, у которых инактивация киназной активности осуществляли АТФ-аналогом 1-NM-PP1, после индукции ДНР с помощью НО-эндонуклеазы в  $G_1$ -фазе не наблюдали индукцию “чекпойнта” [86]. Наблюдаемая разница, возможно, связана с различной природой повреждения 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. Остановка в фазе  $G_1$  может осуществляться за счет контроля активности некоторых форм киназы посредством регуляции транскрипции  $G_1$ -циклинов. Действительно,  $G_1$ -циклины, в норме необходимые для перехода  $G_1/S$ , инактивируются после повреждения молекул ДНК. Показано, что повреждения ДНК активируют киназу Rad53, которая фосфорилирует и, тем самым, инактивирует Swi6, коактиватор транскрипции  $G_1$ -циклинов *CLN1* и *CLN2* [137, 138]. Гиперэкспрессия циклинов или мутации каталитической субъединицы CDK1, повышающие аффинность к  $G_1$ -циклинам, инактивируют остановку в фазе  $G_1$ . МД-симулирование структуры мутантной формы киназы *Cdc28-srm* выявило смещение петли PSTAIRE как возможную причину модификации взаимодействия с циклинами [139]. В фазе  $G_1$  киназа CDK1 выступает главным образом в качестве эффектора “чекпойнт”-контроля.

#### ФАЗА $S$

Остановку клеточного деления в фазе  $S$  вызывает ГМ, подавляющая репликацию ДНК в результате истощения пула предшественников нуклеотидов дНТФ, преимущественно в результате ингибирования рибонуклеотидредуктазы (РНР) [140]. В литературе данные об участии CDC28 в  $S$ -“чекпойнте” отсутствуют. Прямое изучение функционирования киназы показало, что CDC28 не влияет на индукцию остановки в фазе  $S$ . Синхронизация *cdc28-as1* клеток в  $S$ -фазе не влияла на чувствительность к летальному действию ГМ или метилметансульфоната (ММС) и образование Ddc2-фокусов [141]. Эти данные согласуются с представлением, что киназа CDC28 сама по себе не является существенной для активации Rad53 в этой фазе клеточного

цикла [95]. 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) [86] и ММС [141]. Фосфорилирование Rad53, индуцированное флеомицином, было частично снижено у клеток *cdc28-as1*, обработанных 1-NP-PP1 [141].

Мутации *cdc28-srm* [135], *cdc28-5M* [136] и *cdc28-Y19F* или ингибирование киназной активности [142] также не влияли на S-“чекпойнт”, но наблюдалось небольшое влияние мутаций *cdc28-srm*, *cdc28-5M* и *cdc28-as1* на чувствительность к ГМ [135, 141]. Мутация *cdc28-srm* влияла также на остановку деления в поздней S/G<sub>2</sub> и в G<sub>2</sub>-фазах у репликативных мутантов *cdc6-1* и *cdc9-1* соответственно [135]. Возможно, что влияние CDC28 на остановку клеточного цикла в фазе S пока недостаточно изучено.

Длительная остановка репликативной вилки может приводить к коллапсу и возникновению ДНР. После обработки ГМ часть клеток *cdc28-5M* содержит фракцию суб-G1-ДНК, что свидетельствует о митотической катастрофе и согласуется с предположением об участии CDC28 в предотвращении митотической катастрофы [143].

**Поздние *ori*.** При репликации эукариотических клеток имеются множественные сайты начала репликации (*ori*), активация которых осуществляется не одновременно, а постепенно. Включение *ori*-репликации ингибируется в фазе S, если повреждения ДНК или остановившаяся на повреждении ДНК репликативная вилка активируют эффекторные киназы. Rad53 подавляет активацию поздних *ori*-репликации [144, 145] на стадии после образования пререпликативного комплекса (пре-РК), но до образования преиницирующего комплекса (пре-ИК) [10]. Киназа Rad53, так же как и в фазе G<sub>1</sub>, ингибирует оба CDK1- и DDK-зависимые киназные пути инициации репликации, которые с избытком блокируют дальнейшее включение *ori* [145]. Rad53 ингибирует DDK, фосфорилируя ее субединицу Dbf4 (ГМ-индуцированное гиперфосфорилирование Dbf4 зависит от Rad53 и Mec1), что способствует удалению ее из хроматина [146–149]. В то же время CDK1-путь блокируется Rad53-опосредованным фосфорилированием субстрата CDK1, Sld3. Это позволяет CDK1 в фазе S в присутствии повреждения ДНК сохранять активность, 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 поздних *ori*-репликации (см. рисунок).

**Теломеры.** Концы хромосом (теломеры) имеют особенности репликации и структуры.

Инактивация экз-комплекса вызывает оголение теломер, сопровождающееся деградацией теломерной ДНК. Накопление онДНК сверх порогового значения вызывает ответ клетки на повреждение ДНК и остановку цикла деления в G<sub>2</sub>/M [11, 12, 150].

Комплекс CST (Cdc13-Stn1-Ten1) является эволюционно консервативным RPA-подобным комплексом, связывающимся с теломерным 3'-хвостом онДНК [11, 151, 152]. Полагают, что CST предотвращает процессинг теломерной онДНК, подобно RPA в случае ДНР [153]. 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 G<sub>1</sub>-арестованных клетках, причем клетки сохраняли высокую жизнеспособность [150]. Однако в клетках, арестованных в G<sub>2</sub>/M-фазе, теломерная ДНК подвергалась интенсивной деградации, и клетки со временем гибли. Отсутствие деградации С-конца теломер в фазе G<sub>1</sub> имеет сходство со стабильностью индуцированных НО-эндонуклеазой концов ДНР в G<sub>1</sub>-арестованных клетках [154] и с неспособностью процессировать такие ДНР, обусловленной отсутствием активности Cdc28/Clb в этот момент [86, 155]. Таким образом, процессинг как нефункциональных теломер, так и случайных ДНР ферментами репарации ДНК регулируется способом, зависящим от стадии клеточного цикла и CDK1 (Cdc28/Clb). Cdc13 является субстратом киназы CDK1 [10]. Оголенные теломеры узнаются комплексом Ddc1-Mec3-Rad17. В деградации некэпированных теломер участвуют обе ветви Exo1 и Sgs1, а также другие нуклеазы. В расщеплении незащищенных теломер, но не концов ДНР, участвует также 5'-3'-геликаза Pif1. В клетках почкующихся дрожжей комплекс CST играет двойную роль – ингибирует ответ на повреждения ДНК, как ассоциированный с ДНР и иницируемый Exo1, так и ассоциированный с репликацией и иницируемый геликазой Pif1 [156]. Иными словами, ответ на незащищенных теломерах частично обусловлен сходством с ДНР, частично – дефектом репликации ДНК.

В результате деградации образуется протяженный трэк онДНК, который вызывает утрату жизнеспособности и стимулирует Mec1-зависимую индукцию остановки клеточного цикла, аналогично ответу на ДНР [11, 157, 158]. MRX подавляет деградацию, привлекая протекторные теломерные белки (теломераза). Деградация эндонуклеазой Sae2, по-видимому, стимулирует нуклеазную активность Mre11. В результате инцизии 3'-нити ДНР освобождается от комплекса MRX и активируется Mec1-зависимый ответ [95]. И, наоборот,



в отсутствие деградации комплекса MRX сохраняет стабильную связь с ДНР и через свою субъединицу Xrs2 осуществляет активацию киназы Tel1 [159, 160]. Затем Tel1, аналогично Mec1, индуцирует остановку, связывая медиатор Rad9 и активируя последующий киназный каскад [160]. Киназа Tel1, по-видимому, имеет дополнительную функцию в деградации ДНР [51].

### РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ

Программа транскрипции в процессе клеточного цикла определяет порядок его событий и является мишенью сигналов, регулирующих прохождение клеточного цикла, в том числе сигналов “чекпойнта”. “Чекпойнт”-ответ включает в себя индукцию транскрипции генов, осуществляющих репарацию поврежденной ДНК или стабилизацию репликативной вилки в случае нарушения репликации. Транскрипционный ответ обеспечивают киназы Mec1, Rad53 и фосфорилируемая ею киназа Dun1 (см. рисунок).

Экспрессия  $G_1/S$ -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 [11]. SBF функционирует в основном как транскрипционный активатор в  $G_1$ , MBF осуществляет регуляцию транскрипции при переходе  $G_1/S$ -фазы. 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 фактор MBF (Swi6/Mbp1), фактор транскрипции циклинов Clb5 и Clb6 и других генов репликации ДНК. Циклины Clb5 и Clb6 участвуют в сборке пре-ИК, активируя Cdc28/Clb-зависимое фосфорилирование белков Sld2 и Sld3 [11]. Так как S-CDK управляют вступлением и прохождением фазы  $S$ , они являются привлекательными мишенями “чекпойнта”. Действительно, S-циклины Clb5 и Clb6 регулируются в ответ на генотоксический стресс [161]. Нестабильный Clb6, рано элиминирующийся в условиях невозмущенной фазы  $S$ , стабилизируется в ответ на стресс. Для стабилизации необходима киназа Rad53 (но не киназа Dun1), фактор MBF и активный синтез белка *de novo*. Swi6, транс-активационная субъединица MBF, сохраняет ядерную локализацию в клетках в условиях стресса, несмотря на наличие Clb6. Cdc28/Clb6, но не Cdc28/Clb5, опосредует выведение Swi6 из ядра в невозмущенной фазе  $S$  как часть регуляторного контроля активности MBF [162]. Однако S-“чекпойнт” отменяет такой контроль. Известно,

что Rad53 фосфорилирует Swi6 [138]. 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 репликативный стресс. Иными словами, хотя  $CLB5$ -мРНК постоянно присутствует в течение кризиса репликации, синтеза Clb5 не происходит. В ответ на генотоксический стресс стабилизируется пул нестабильной формы Clb5. Можно предположить, что реактивация MBF в ответ на 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  $S$  [149].

Известно два транскрипционных репрессора Whi5 и Nrm1 транскрипционных факторов SBF и MBF [163–165]. Репрессор Whi5 подавляет SBF-зависимую транскрипцию в ранней фазе  $G_1$  до вступления в новый цикл деления, а Nrm1 служит корепрессором MBF вне фазы  $G_1$ . 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 [166]. Примером транскрипционного ответа также служит инактивация Dun1-зависимым фосфорилированием транскрипционного репрессора Crt1, ведущая к активации генов, индуцируемых повреждениями ДНК [167]. Однако регуляция экспрессии индуцибельных генов сложна и включает другие транскрипционные факторы [168]. Упомянутый путь влияет только на относительно небольшую часть из > 200 транскриптов, индукция которых наблюдается при генотоксическом стрессе. Отметим, что остановка клеточного цикла при повреждении ДНК включает регуляцию синтеза рибонуклеотидредуктазы для

синтеза большого количества ДНТФ, в результате фосфорилирования киназой Dun1 и деградации ингибитора Sml1 [169–171].

### ФАЗА $G_2$

В фазе  $G_2/M$  необходима активность CDK1 для полной активации Rad53 ДНР, индуцированными ИР и НО-эндонуклеазой [86]. Это связано с процессированием концев ДНР. Кроме того, в  $G_2/M$ -арестованных клетках наблюдалось CDK1-зависимое фосфорилирование Rad9 при активации Rad53 в результате искусственной колокализации сенсоров “чекпойнта”, даже в отсутствии повреждения ДНК [96]. С другой стороны, ингибирование CDK1 не нарушало ГМ-индуцированную активацию Rad53 [141, 172]. Для активации Rad53 ММС также не нужна активность CDK1 на границе  $G_2/M$ -фазы [86]. Таким образом, условия активации Rad53 зависят от типа повреждения или стадии клеточного цикла.

ДНР ДНК, возникшие в  $G_2/M$ , приводят к умеренной, а в фазе  $S$  – к более сильной индукции “чекпойнта” [173]. По-видимому, индукция “чекпойнта” остановившейся репликативной вилкой либо не требует активности CDK1, либо ответ “чекпойнта” настолько сильно выражен, что перекрывает необходимость в ней. В экспериментах с мутацией *cdc28-srm* не было обнаружено нарушений  $G_2$ -“чекпойнта” повреждениями ДНК (ИР) и блоком репликации (ГМ), но они наблюдались у репликативных мутантов *cdc6-1* и *cdc9-1* при непермиссивной температуре [135]. Однако использование мутации *cdc28-as1* [F88G] показало, что в фазе  $G_2$  для активации Mec1-зависимой остановки НО-ДНР требуется *CDC28* [86]. Более того, у мутанта *cdc28-5M*, характеризующегося отсутствием остановки клеточного цикла при индукции повреждений ДНК, наблюдалось снижение киназной активности, ассоциированной с Clb2 и необходимой для выхода из митоза [136]. Таким образом, различные мутантные аллели *CDC28* вызывают различные дисфункциональные последствия и 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 фазе  $G_1$  вскоре после Старта, а митотическая сегрегация хромосом контролируется позднее на Границе метафаза/анафаза. При неправильной сборке веретена или при нарушении 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/В-циклин. Некоторые из этих форм (CDC28/Clb3 и CDC28/Clb4) необходимы для инициации митоза и образования митотического веретена, другие (CDC28/Clb1 и CDC28/Clb2) необходимы для выхода из митоза и завершения клеточного цикла.

Для перехода из метафазы в анафазу требуется деградация ингибитора расхождения сестринских хроматид Pds1. Митотическая форма CDK1 участвует в активации протеасомы APC/ $C^{dc20}$  в результате фосфорилирования регуляторной субъединицы Cdc20. Протеосома в свою очередь осуществляет убиквитин-зависимую деградацию анафазного ингибитора Pds1 и циклинов Clb5 и Clb3. Повреждения ДНК вызывают замедление митоза посредством ингибирования убиквитинизации Pds1, в результате фосфорилирования секурина Pds1 киназой CDK1 [174]. Фосфорилированный секурин Pds1 удерживает сепаразу Esp1 [175]. Сепараза расщепляет одну из субъединиц комплекса (Med1p/Sec1), ответственного за когезию хроматид. Второй регуляторный путь включает фосфорилирование Cdc20 киназой Rad53, ингибирующее взаимодействие между Cdc20 и Pds1 [176], и также опосредует индуцибельное фосфорилирование субъединицы когезинового комплекса [138].  $S$ -специфичные циклины Clb5 и Clb6 обеспечивают загрузку когезиновых комплексов на хроматин в ранней фазе  $S$ . 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 Clb5 и Clb6) и защитная (функция Pds1) – необходимы для успешной когезии [177].

Выход из митоза ассоциируется с инактивацией CDC28/Clb2. В условиях остановки клеточного цикла в фазе  $G_2/M$  киназа Rad53 поддерживает высокую киназную активность CDK1 посредством ингибирования киназы Cdc5, участвующей в деградации циклинов и в выходе из митоза [174].

### ВОССТАНОВЛЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ

ДНР ДНК индуцируют остановку цикла деления. При этом основной механизм остановки – предотвращение деградации секурина Pds1 протеасомой APC/ $C^{dc20}$ . 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* [87, 178–180]. В этом случае клетки остаются арестованными длительное время около шести циклов деления (12–15 ч).

Восстановление осуществляют фосфатазы Ptc2, Ptc3 и Rph3, дефосфорилирующие Rad53 [45, 181]. Клетки дикого типа восстанавливались спустя 40 мин после 3-часовой инкубации с ГМ и, как показал FACS-анализ, полностью завершили синтез ДНК [141]. В клетках дикого типа киназа Rad53 в основном дефосфорилирована спустя 1 ч и почти полностью дефосфорилирована спустя 2 ч после удаления ГМ. Мутант *cdc28-5M* завершал синтез ДНК спустя 40 мин, но выход из митоза проходил медленнее, чем в клетках дикого типа. Мутация *cdc28-as1* не влияла на степень дефосфорилирования Rad53.

Появились данные о необходимости посттрансляционного фосфорилирования Rfa2 [178] и Rad53 в процессе адаптации. Киназа Rad53 имеет 13 сайтов автофосфорилирования и 14 сайтов фосфорилирования киназами Mec1, Cdc5 и CDK1 [42]. Активность киназы Cdc5, инициирующей выход из митоза, ограничивается фазой  $G_2/M$ . В ответ на повреждения ДНК эта киназа фосфорилируется Rad53-зависимым способом [182]. Было показано, что киназа Cdc5 участвует в адаптации [179]. Фосфорилирование С-конца Rad53 по S774 киназой CDK1 и S789, S791 киназой Cdc5 зависит от фазы клеточного цикла, обнаруживается в отсутствие повреждения в фазах  $G_1$ ,  $G_2$  и  $M$  и имеет пик фосфорилирования в митозе. Фосфорилирование не влияет на индукцию “чекпойнта” [183, 184], но предотвращает его адаптацию [183], а также важно для функционирования Rad53 в регуляции морфогенеза клетки [184], обеспечивающего ее выживаемость в процессе репликативного стресса. Предполагается, что эта дополнительная модификация обеспечивает тонкую настройку уровня фосфорилирования Rad53, от которого зависит активация киназы Rad53, ее поддержание и участие в адаптации. В фазе  $S$  в отсутствие дополнительного фосфорилирования киназа менее чувствительна к возникающей в процессе репликации онДНК и наблюдается менее сильный ответ на повреждения ДНК [185, 186]. В то же время она высокочувствительна к повреждениям ДНК в фазе  $G_2/M$ . Клетки дикого типа могут адаптироваться в  $G_2/M$  при наличии одного, но не двух повреждений ДНК [12].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор приносит благодарность младшему научному сотруднику ЛРБ ОИЯИ Н.И. Жучкиной за помощь в изготовлении рисунка.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mills K.D., Sinclar D.A., Guarente L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks // *Cell*. 1997. V. 97. P. 609–620.
2. Ritchie K.B., Mallory J.C., Petes T.D. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 6065–6075.
3. Elledge S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis // *Science*. 1996. V. 274. P. 1664–1672.
4. Roos W.P., Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis // *Trends Mol. Med.* 2006. V. 12. P. 440–450.
5. Terasima T., Tolmach L.J. Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle // *Biophys. J.* 1963. V. 3. P. 11–33.
6. Johnson R.G., Walmsley J.G., Goodin L.J., Morrison H.G. Ultraviolet-induced delay of budding in synchronized yeast cells // *Radiat. Res.* 1973. V. 53. P. 134–142.
7. Weinert T.A., Hartwell L.H. The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. 1988. V. 241. P. 317–322.
8. Колтовая Н.А. Активация репарации и чекпойнт-контроля дуплетными разрывами ДНК. Каскад активационного фосфорилирования белков // *Генетика*. 2009. Т. 45. С. 5–21.
9. Demeter J., Lee S.E., Haber J.E. et al. The DNA damage checkpoint signal in budding yeast is nuclear limited // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. P. 487–492.
10. Колтовая Н.А. Регуляция клеточного цикла циклин-зависимой киназой CDK1/CDC28 // *Генетика*. 2013. Т. 49. С. 797–813.
11. Garvik B., Carson M., Hartwell L. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the *RAD9* checkpoint // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 6128–6138.
12. Lee S.E., Moore J.K., Holmes A. et al. *Saccharomyces* Ku70/mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to  $G_2/M$  arrest after DNA damage // *Cell*. 1998. V. 94. P. 399–409.
13. Giannattasio M., Lazzaro F., Longhese M.P. et al. Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 429–438.
14. Tsubouchi H., Ogawa H. A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 260–268.
15. Putnam C.D., Jaehning E., Kolodner R.D. Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae* // *DNA Repair (Amst.)*. 2009. V. 8. P. 974–982.
16. Majka J., Binz S., Wold M. et al. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp

- to 5'-DNA junctions // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 27855–27861.
17. Abraham R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 2177–2196.
  18. Paciotti V., Clerici M., Lucchini G. et al. The checkpoint protein Ddc2, functionally related to *S. pombe* Rad26, interacts with Mec1 and is regulated by Mec1-dependent phosphorylation in budding yeast // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 2046–2059.
  19. Rouse J., Jackson S.P. Lcd1 recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 857–869.
  20. Lee J.H., Paull T.T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex // *Science.* 2005. V. 308. P. 551–554.
  21. Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation // *Nature.* 2003. V. 421. P. 499–506.
  22. Majka J., Niedziela-Majka A., Burgers P.M. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint // *Mol. Cell.* 2006. V. 24. P. 891–901.
  23. Navadgi-Patil V.M., Burgers P.M. Yeast DNA replication protein Dpb11 activates the Mec1/ATR checkpoint kinase // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 35853–35859.
  24. Navadgi-Pati V.M., Burgers P.M. The unstructured C-terminal tail of the 9-1-1 clamp subunit Ddc1 activates Mec1/ATR via two distinct mechanisms // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. P. 743–753.
  25. Puddu F., Granata M., Di Nola L. et al. Phosphorylation of the budding yeast 9-1-1 complex is required for Dpb11 function in the full activation of the UV-induced DNA damage checkpoint // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 4782–4793.
  26. Pfander B., Diffley J.F.X. Dpb11 coordinates Mec1 kinase activation with cell cycle-regulated Rad9 recruitment // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 4897–4907.
  27. Huyen Y., Zgheib O., Ditullio R.A. et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks // *Nature.* 2004. V. 432. P. 406–411.
  28. Toh G., O'Shaughnessy A., Jimeno S. et al. Histone H2A phosphorylation and H3 methylation are required for a novel Rad9 DSB repair function following checkpoint activation // *DNA Repair.* 2006. V. 5. P. 693–703.
  29. Downs J.A., Lowndes N.F., Jackson S.P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* H2A in DNA repair // *Nature.* 2000. V. 408. P. 1001–1004.
  30. Brush G.S., Kelly T.J. Phosphorylation of the replication protein A large subunit in the *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint response // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3725–3732.
  31. Shroff R., Arbel-Eden A., Pilch D. et al. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 1703–1711.
  32. Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M.J. et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5. P. 675–679.
  33. Ward I.M., Minn K., Jorda K.G. et al. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX // *Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19579–19582.
  34. Conde F., Refolio E., Cordon-Preciado V. et al. The Dot1 histone methyltransferase and the Rad9 checkpoint adaptor contribute to cohesion-dependent double-strand break repair by sister chromatid recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2009. V. 182. P. 437–446.
  35. Botuyan M.V., Lee J., Ward I.M. et al. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair // *Cell.* 2006. V. 127. P. 1361–1373.
  36. Javaheri A., Wysocki R., Jobin-Robitaille O. et al. Yeast G1 DNA damage checkpoint regulation by H2A phosphorylation is independent of chromatin remodeling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 13771–13776.
  37. Gilbert C.S., van den Bosch M., Green C.M. et al. The budding yeast Rad9 checkpoint complex: chaperone proteins are required for its function // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. P. 953–958.
  38. Gilbert C.S., Green C.M., Lowndes N.F. Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. P. 129–136.
  39. Pelliccioli A., Foiani M. Signal transcription: how rad53 kinase is activated // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. R769–771.
  40. Sun Z., Hsiao J., Fay D.S. et al. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint // *Science.* 1998. V. 281. P. 272–274.
  41. Schwartz M.F., Duong J.K., Sun Z. et al. Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 1055–1065.
  42. Sweeney F.D., Yang F., Chi A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. P. 1364–1375.
  43. Usui T., Foster S.S., Petrini J.H. Maintenance of the DNA-damage checkpoint requires DNA-damage-induced mediator protein oligomerization // *Mol. Cell.* 2009. V. 33. P. 147–159.
  44. Ubersax J.A., Ferrell J.E. Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. P. 530–541.
  45. Leroy C., Lee S.E., Vaze M.B. et al. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. P. 827–835.
  46. Gunjan A., Verreault A. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae* // *Cell.* 2003. V. 115. P. 537–549.

47. Sanchez Y., Desany B.A., Jones W.J. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways // *Science*. 1996. V. 271. P. 357–360.
48. Paciotti V., Clerici M., Scotti M. et al. Characterization of mec1 kinase-deficient mutants and of new hypomorphic mec1 alleles impairing subsets of the DNA damage response pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 3913–3925.
49. Mordes D.A., Cortez D. Activation of ATR and related PIKKs // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 2809–2812.
50. Giannattasio M., Sommariva E., Vercillo R. et al. A dominant-negative MEC3 mutant uncovers new functions for the Rad17 complex and Tel1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 12997–13002.
51. Mantiero D., Clerici M., Lucchini G. et al. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks // *EMBO J.* 2007. V. 8. P. 380–387.
52. Baldo V., Testoni V., Lucchini G. et al. Dominant TEL1-hy mutations compensate for Mec1 lack of functions in the DNA damage response // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 358–375.
53. Nakada D., Shimomura T., Matsumoto K. et al. The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 1715–1724.
54. Van den Bosch M., Lowndes N.F. Remodelling the Rad9 checkpoint complex: preparing Rad53 for action // *Cell Cycle*. 2004. V. 3. P. 119–122.
55. Toh G.W., Lowndes N.F. Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage // *Biochem. Soc. Transact.* 2003. V. 31. P. 242–246.
56. Smolka M., Albuquerque C., Chen S. et al. Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag // *Mol. Cell. Proteomics*. 2005. V. 4. P. 1358–1369.
57. Tourrière H., Pasero P. Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites // *DNA Repair (Amst.)*. 2007. V. 6. P. 900–913.
58. Cobb J.A., Bjergbaek L., Gasser S.M. RecQ helicases: at the heart of genetic stability // *FEBS Lett.* 2002. V. 529. P. 43–48.
59. Frei C., Gasser S.M. RecQ-like helicases: the DNA replication checkpoint connection // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. P. 2641–2646.
60. Hoegge C., Pfander B., Moldovan G.L. et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO // *Nature*. 2002. V. 419. P. 135–141.
61. Bando M., Katou Y., Komata M. et al. Csm3, Tof1, and Mrc1 form a heterotrimeric mediator complex that associates with DNA replication forks // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 34355–34365.
62. Gambus A., Jones R.C., Sanchez-Diaz A. et al. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 358–366.
63. Alcasabas A.A., Osborn A.J., Bachant J. et al. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53 // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 958–965.
64. Osborn A.J., Elledge S.J. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53 // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 1755–1767.
65. Mohanty B., Bairwa N., Bastia D. The Tof1p-Csm3p protein complex counteracts the Rrm3p helicase to control replication termination of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 879–902.
66. Katou Y., Kanoh Y., Bando M. et al. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex // *Nature*. 2003. V. 424. P. 1078–1083.
67. Wang H., Elledge S.J. Genetic and physical interactions between DPB11 and DDC1 in the yeast DNA damage response pathway // *Genetics*. 2002. V. 160. P. 1295–1304.
68. Puddu F., Piergiorganni G., Plevani P. et al. Sensing of replication stress and mec1 activation act through two independent pathways involving the 9-1-1 complex and DNA polymerase  $\epsilon$  // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. e1002022.
69. Lou H., Komata M., Katou Y. et al. Mrc1 and DNA polymerase  $\epsilon$  function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint // *Mol. Cell.* 2008. V. 32. P. 106–117.
70. Gottifredi V., Prives C. The S phase checkpoint: when the crowd meets at the fork // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 16. P. 355–368.
71. De Antoni A., Gallwitz D. A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene*. 2000. V. 246. P. 179–185.
72. Hori Y., Shirahige K., Obuse C. et al. Characterization of a novel CDC gene (ORC1) partly homologous to CDC6 of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. Cell.* 1996. V. 7. P. 409–418.
73. Berens T.J., Toczyski D.P. Colocalization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo // *Mol. Biol. Cell.* 2012. V. 23. P. 1058–1067.
74. Komata M., Bando M., Araki H. et al. The direct binding of Mrc1, a checkpoint mediator, to Mcm6, a replication helicase, is essential for the replication checkpoint against methyl methanesulfonate-induced stress // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 5008–5019.
75. Cotta-Ramusino C., Fachinetti D., Lucca C. et al. Exo1 processes stalled replication forks and counteracts fork reversal in checkpoint-defective cells // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 153–159.
76. Redon C., Pilch D.R., Bonner W.M. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* H2A serine 129 mutant suggests a functional relationship between H2A and the sister-chromatid cohesion partners Csm3-Tof1 for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage // *Genetics*. 2006. V. 172. P. 67–76.

77. Unal E., Arbel-Eden A., Sattler U. et al. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesion domain // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 991–1002.
78. Marini F., Pelliccioli A., Paciotti V. et al. A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response // *EMBO J*. 1997. V. 16. P. 639–650.
79. Dotiwala F., Haase J., Arbel-Eden A. et al. The yeast DNA damage checkpoint proteins control a cytoplasmic response to DNA damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 107. P. 11358–11363.
80. Королев В.Г. Молекулярные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК у эукариот // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2007. Т. 47. С. 389–401.
81. Lisby M., Rothstein R., Mortensen U.H. Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 8276–8282.
82. Antunez de Mayolo A., Lisby M., Erdeniz N. et al. Multiple start codons and phosphorylation result in discrete Rad52 protein species // *Nucl. Acids Res*. 2006. V. 34. P. 2587–2597.
83. Ubersax J.A., Woodbury E.L., Quanq P.N. et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1 // *Nature*. 2003. V. 425. P. 859–864.
84. Din S., Brill S.J., Fairman M.P. et al. Cell-cycle-regulated phosphorylation of DNA replication factor F from human and yeast cells // *Genes Dev*. 1990. V. 4. P. 968–977.
85. Kim H.S., Brill S.J. MEC1-dependent phosphorylation of yeast RPA1 in vitro // *DNA repair (Amst)*. 2003. V. 2. P. 1321–1335.
86. Ira G., Pelliccioli A., Balijja A. et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1 // *Nature*. 2004. V. 431. P. 1011–1017.
87. Pelliccioli A., Lee S.E., Lucca C. et al. Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest // *Mol. Cell*. 2001. V. 7. P. 293–300.
88. Clerici M., Baldo V., Mantiero D. et al. A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1 // *Mol. Cell Biol*. 2004. V. 24. P. 10126–10144.
89. Jazayeri A., Falck J., Lukas C. et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. P. 37–45.
90. Huertas P., Cortes-Ledesma F., Sartori A.A. et al. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination // *Nature*. 2008. V. 455. P. 689–692.
91. Kosugi S., Hasebe M., Tomita M. et al. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 10171–10176.
92. Melo J.A., Cohen J., Toczyski D.P. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo // *Genes Dev*. 2001. V. 15. P. 2809–2821.
93. Kondo T., Wakayama T., Naiki T. et al. Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms // *Science*. 2001. V. 294. P. 867–870.
94. Zou L., Cortez D., Elledge S.J. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 198–208.
95. Lisby M., Barlow J.H., Burgess R.C. et al. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins // *Cell*. 2004. V. 118. P. 699–713.
96. Bonilla C.Y., Melo J.A., Toczyski D.P. Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage // *Mol. Cell*. 2008. V. 30. P. 267–276.
97. Barlow J.H., Lisby M., Rothstein R. Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1 // *Mol. Cell*. 2008. V. 30. P. 73–85.
98. Колтовая Н., Никулушкина Ю., Кадышевская Е. и др. Взаимодействие чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RA53* с генами *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1* и *SRM12/HF11* в определении чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к действию ионизирующей радиации // *Генетика*. 2008. Т. 44. С. 1045–1055.
99. Moses A., Heriche J.K., Durbin R. Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase // *Genome Biol*. 2007. V. 8. R23.
100. Albuquerque C., Smolka M., Payne S. et al. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis // *Mol. Cell Proteomics*. 2008. V. 7. P. 1389–1396.
101. Holt L.J., Tuch B.B., Villen J. et al. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution // *Science*. 2009. V. 325. P. 1682–1686.
102. Caspari T., Murray J.M., Carr A.M. Cdc2-cyclin b kinase activity links Crb2 and Rgh1-topoisomerase III // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 1195–1208.
103. Du L.L., Nakamura T.M., Russell P. Histone modification-dependent and independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 1583–1596.
104. Esashi F., Yanagida M. Cdc2 phosphorylation of Crb2 is required for reestablishing cell cycle progression after the damage checkpoint // *Mol. Cell*. 1999. V. 4. P. 167–174.
105. Emili A. MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage // *Mol. Cell*. 1998. V. 2. P. 183–189.
106. Pfander B., Diffley J.F. Dpb11 coordinates Mec1 kinase activation with cell cycle-regulated Rad9 recruitment // *EMBO J*. 2011. V. 30. P. 4897–4907.
107. Granata M., Lazzaro F., Novarina D. et al. Dynamics of Rad9 chromatin binding and checkpoint function are

- mediated by its dimerization and are cell cycle-regulated by CDK1 activity // PLoS Genet. 2010. V. 6. e1001047.
108. Blankley R.T., Lydall D. A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 601–608.
  109. Sanchez Y., Bachant J., Wang H. et al. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms // Science. 1999. V. 286. P. 1166–1171.
  110. Gardner R., Putman C.W., Weinert T. RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast // EMBO J. 1999. V. 18. P. 3173–3185.
  111. O'Shaughnessy A.M., Grenon M., Gilbert C. et al. Multiple approaches to study *S. cerevisiae* Rad9, a prototypical checkpoint protein // Methods Enzymol. 2006. V. 409. P. 131–150.
  112. Vialard J.E., Gilbert C.S., Green C.M. et al. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage // EMBO J. 1998. V. 17. P. 5679–5688.
  113. Grenon M., Gilbert C., Lowndes N.F. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. 844–847.
  114. Grenon M., Costelloe T., Jimeno S. et al. Docking onto chromatin via the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Tudor domain // Yeast. 2007. V. 24. P. 105–119.
  115. Smits V.A. Spreading the signal: dissociation of Chk1 from chromatin // Cell Cycle. 2006. V. 5. P. 1039–1043.
  116. Goto H., Kariya R., Shimamoto M. et al. Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway // Cancer Sci. 2012. V. 103. P. 775–781.
  117. Tapia-Alveal C., Calonge T., O'Connell M.J. Regulation of chk1 // Cell Div. 2009. V. 4. P. 1–8.
  118. Abreu C.M., Kumar R., Hamilton D. et al. Site-specific phosphorylation of the DNA damage response mediator Rad9 by cyclin-dependent kinases regulates activation of checkpoint kinase 1 // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 4. e1003310.
  119. Hammet A., Magill C., Heierhorst J. et al. Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast // EMBO J. 2007. V. 8. P. 851–857.
  120. Wysocki R., Javaheri A., Allard S. et al. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9 // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. P. 8430–8443.
  121. Chen Y., Caldwell J.M., Pereira E. et al. ATR(Mec1) phosphorylation-independent activation of Chk1 in vivo // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 182–190.
  122. Gurley L.R., Valdez J.G., Buchanan J. Characterization of the mitotic specific phosphorylation site of histone H1. Absence of a consensus sequence for the p34/cdc2/cyclin B kinase // J. Biol. Chem. 1995. V. 290. P. 27653–27660.
  123. Swaney D.L., Beltrao P., Starita L. et al. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation crosstalk in protein degradation // Nat. Methods. 2013. V. 10. doi:10.1038/nmeth.2519.
  124. Alexandrow M.G., Hamlin J.L. Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation // J. Cell Biol. 2005. V. 168. P. 875–886.
  125. Yu Q., Kuzmiak H., Zou Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* linker histone Hho1p functionally interacts with core histone H4 and negatively regulates the establishment of transcriptionally silent chromatin // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 740–750.
  126. Downs J.A., Kosmidou E., Morgan A. et al. Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone // Mol. Cell. 2003. V. 11. P. 1685–1692.
  127. Georgieva M., Roguev A., Balashev K. et al. Hho1p, the linker histone of *Saccharomyces cerevisiae*, is important for the proper chromatin organization in vivo // Biochem. Biophys. Acta. 2012. V. 1819. P. 366–374.
  128. Georgieva M., Staneva D., Uzunova K. et al. The linker histone in *Saccharomyces cerevisiae* interacts with actin-related protein 4 and both regulate chromatin structure and cellular morphology // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2015. V. 59. P. 182–192.
  129. Awad S., Ryan D., Prochasson P. et al. The Snf2 homolog Fun30 acts as a homodimeric ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 9477–9484.
  130. Chen X., Cui D., Papusha A. et al. The Fun30 nucleosome remodeler promotes resection of DNA double-strand break ends // Nature. 2012. V. 489. P. 576–580.
  131. Lo W.S., Duggan L., Emre N. et al. Snf1 – a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription // Science. 2001. V. 293. P. 1142–1146.
  132. Clements A., Poux A.N., Lo W.S. et al. Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase // Mol. Cell. 2003. V. 12. P. 461–473.
  133. Koltovaya N., Guerasimova A., Tchekhouta I. et al. NET1 and HFI1 genes of yeast mediate both chromosome maintenance and mitochondrial rho<sup>-</sup> mutagenesis // Yeast. 2003. V. 20. P. 955–971.
  134. John S., Howe L., Tajrov S.T. et al. The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex // Genes Dev. 2000. V. 14. P. 11196–11208.
  135. Кадышевская Е.Ю., Колтовая Н.А. Участие генов *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1* в чекпойнт-контроле у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2009. V. 45. P. 458–470.

136. Li X., Cai M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. P. 2723–2734.
137. Sidorova J.M., Breeden L.L. Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 3032–3045.
138. Sidorova J.M., Breeden L.L. Rad53 checkpoint kinase phosphorylation site preference identified in the Swi6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. P. 3405–3416.
139. Холмуродов Х.Т., Колтовая Н.А. МД-моделирование киназы CDK2-циклин А: влияние замены аминокислот Gly16 → Ser16 и Arg274 → Gln274 на конформацию киназной субъединицы // *Биофизика.* 2009. Т. 54. С. 999–1004.
140. Allen J.B., Zhou Z., Siede W. et al. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 2401–2415.
141. Enserink J.M., Hombaur H., Huang M. et al. Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in *S. cerevisiae* // *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. P. 423–437.
142. Sorger P.K., Murray A.W. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34<sup>cdc28</sup> // *Nature.* 1992. V. 355. P. 365–368.
143. Kitazono A.A., Kron S.J. An essential function of yeast cyclin-dependent kinase Cdc28 maintains chromosome stability // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 48627–48634.
144. Santocanale C., Diffley J.F.X. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication // *Nature.* 1998. V. 395. P. 615–618.
145. Zegerman P., Diffley J.F. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint // *DNA Repair (Amst.)*. 2009. V. 8. P. 1077–1088.
146. Cheng L., Collyer T., Hardy C.F. Cell cycle regulation of DNA replication initiator factor Dbf4p // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 4270–4278.
147. Dohrmann P., Oshiro G., Tecklenburg M. et al. RAD53 regulates DBF4 independently of checkpoint function in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 1999. V. 151. P. 965–977.
148. Pasero P., Duncker B.P., Schwob E. et al. A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 2159–2176.
149. Weinreich M., Stillman B. Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 5334–5346.
150. Vodenicharov M.D., Weillinger R.J. DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase // *Mol. Cell.* 2006. V. 24. P. 127–137.
151. Miyake Y., Nakamura M., Nabetani A. et al. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-strand DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. P. 193–206.
152. Surovtseva Y.V., Churikov D., Boltz K.A. et al. Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. P. 207–218.
153. Gao H., Cervantes R., Mandell E. et al. RPA-like proteins mediate yeast telomere function // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. P. 208–214.
154. Frank-Vaillant M., Marcand S. Transient stability of DNA ends allows non-homologous end joining to precede homologous recombination // *Mol. Cell.* 2002. V. 10. P. 1189–1199.
155. Aylon Y., Liefshitz B., Kupiec M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 4868–4875.
156. Dewar J.M., Lydall D. Similarities and differences between “uncapped” telomeres and DNA double-strand breaks // *Chromosoma.* 2012. V. 121. P. 117–130.
157. Jia X., Weinert T., Lydall D. Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae cdc13-1* mutants // *Genetics.* 2004. V. 166. P. 753–764.
158. Lydall D., Weinert T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest // *Science.* 1995. V. 270. P. 1488–1491.
159. Nakada D., Matsumoto K., Sugimoto K. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism // *Genes Dev.* 2003. V. 17. P. 1957–1962.
160. Usui T., Ogawa H., Petrini J.H. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex // *Mol. Cell.* 2001. V. 7. P. 1255–1266.
161. Palou G., Palou R., Guerra-Moreno A. et al. Cyclin regulation by the S phase checkpoint // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 26431–26440.
162. Geymonat M., Spamos A., Wells G.P. et al. Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6 // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. P. 2277–2285.
163. Costanzo M., Nishikawa J.L., Tang X. et al. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast // *Cell.* 2004. V. 117. P. 899–913.
164. De Bruin R.A., McDonald W., Kalashnikova T. et al. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5 // *Cell.* 2004. V. 117. P. 887–898.
165. De Bruin R., Kalashnikova T., Chahwan C. et al. Constraining G1-specific transcription to late G1-phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback // *Mol. Cell.* 2006. V. 23. P. 483–496.



166. De Bruin R.A., Wittenberg C. All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA // *Cell Cycle*. 2009. V. 8. P. 214–217.
167. Huang M., Zhou Z., Elledge S.J. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor // *Cell*. 1998. V. 94. P. 595–605.
168. Fu Y., Pastushok L., Xiao W. DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 908–926.
169. Elledge S.J., Zhou Z., Allen J.B. et al. DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase // *Bioessay*. 1993. V. 15. P. 333–339.
170. Zhao X., Chabes A., Domkin V. et al. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 3544–3553.
171. Lee Y.D., Elledge S.J. Control of ribonucleotide reductase location through an anchoring mechanism involving Wtm1 // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 334–344.
172. Liberi G., Chiolo I., Pelliccioli A. et al. Srs2 DNA helicase is involved in checkpoint response and its regulation requires a functional Mec1-dependent pathway and Cdk1 activity // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5027–5038.
173. Zierhut C., Diffley J.F. Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double-strand break response // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 1875–1885.
174. Sanchez Y., Bachant J., Wang H. et al. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms // *Science*. 1999. V. 286. P. 1166–1171.
175. Agarwal R., Cohen-Fix O. Phosphorylation of the mitotic regulator Pds1/securing by Cdc28 is required for efficient nuclear localization of Esp1/separase // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 1371–1382.
176. Agarwal R., Tang Z., Yu H. et al. Two distinct pathways for inhibition in response to DNA damage // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 45027–45033.
177. Hsu W.S., Erickson S.L., Tsai H.J. et al. S-phase cyclin-dependent kinases promote sister chromatin cohesion in budding yeast // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. P. 2470–2483.
178. Ghospurkar P.L., Wilson T., Severson A. et al. The DNA damage response and checkpoint adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*: distinct roles for the replication protein A2 (Rfa2) N-terminus // *Genetics*. 2015. V. 199. P. 711–727.
179. Toczyski D.P., Galgoczy D.J., Hartwell L.H. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint // *Cell*. 1997. V. 90. P. 1097–1106.
180. Lee S., Pelliccioli A., Demeter J. et al. Arrest, adaptation, and recovery following a chromosome double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 2000. V. 65. P. 303–314.
181. O'Neill B.M., Szyjka S.J., Lis E.T. et al. Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 9290–9295.
182. Cheng L., Hunke L., Hardy C.F. Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 360–370.
183. Schleker T., Shimada K., Sack R. et al. Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. P. 350–363.
184. Diani L., Colombelli C., Nachimuthu B.T. et al. *Saccharomyces* CDK1 phosphorylates Rad53 kinase in metaphase, influencing cellular morphogenesis // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 32627–32634.
185. Shimada K., Pasero P., Gasser S.M. ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53 activation in S phase // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 3236–3252.
186. Tercero J.A., Longhese M.P., Diffley J.F. A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. P. 1323–1336.

## Kinase CDK1/CDC28 and Control of DNA Integrity in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

N. A. Koltovaya

*Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia*  
E-mail: koltovaya@jinr.ru

The control mechanisms of the DNA integrity and correct cell cycle progression are the most studied in the model eukaryotic organism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the so called checkpoint control was first discovered. Checkpoint delays the cell cycle in the case of DNA damage. Many components of this process have already been identified. The corresponding ortholog proteins have been found in higher eukaryotes, too, including humans. In this study, special attention is given to the participation of the cyclin-dependent kinase CDK1/CDC28, which plays the central role in the regulation of yeast cell division and in the checkpoint control in different phases of the cell cycle.