

P19-2001-284

Н. А. Колтовая, А. Б. Девин*

**О РОЛИ НЕКОТОРЫХ СЧЕКПОИИТ-ГЕИОВ
В ОПРЕДЕЛЕНИИ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Направлено в журнал «Доклады Российской академии наук»

*Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Повреждение наследственного аппарата эукариотических, в частности дрожжевых, клеток способно вызывать остановку клеточного цикла. Этот ответ клеток на генетические повреждения опосредован множественными генами, продукты которых предположительно сканируют хромосомную ДНК и, в случае обнаружения повреждений, обеспечивают задержку клеточного деления. Задержка, как полагают, дает клеткам дополнительное время для репарации повреждений ДНК. В отсутствие задержки в митоз будут вступать клетки с генетическими повреждениями, потомство которых, скорее всего, окажется дефективным или нежизнеспособным. Механизм обратной связи, обеспечивающий остановку клеточного цикла при нарушении его нормального прохождения и именуемый checkpoint-контролем, обнаружен у *Saccharomyces cerevisiae* более 10 лет назад [1]. Значительный интерес исследователей к этому механизму связан, в частности, с широко распространившимся представлением о тесной связи между нарушениями checkpoint-контроля и малигнизацией клеток [2]. К настоящему времени идентифицированы некоторые гены дрожжей, играющие ключевую роль в этом механизме.

Последствиями нарушений checkpoint-регуляции клеточного деления в ответ на повреждения ДНК во многих случаях являются снижение точности митотической передачи наследственных структур и повышение чувствительности клеток к летальным эффектам ДНК-тропных агентов [3]. При изучении генетической системы checkpoint-регуляции не всегда разграничивают эффекты, относящиеся, с одной стороны, к остановке клеточного цикла и, с другой стороны, к чувствительности клеток к повреждающим агентам. Для формирования адекватных представлений о функциях checkpoint-генов и механизмах определения радиочувствительности клеток представляется целесообразным систематическое сопоставление сведений о характере генных взаимодействий, полученных при использовании каждого из указанных критериев в отдельности. В настоящей работе анализировали под этим углом зрения влияние парных сочетаний мутаций в генах, опосредующих различные этапы checkpoint-контроля, на чувствительность дрожжевых клеток к γ -излучению.

Согласно современным представлениям о механизме checkpoint-контроля, действующего в ответ на повреждения ДНК, гены *RAD9*, *RAD17* и *RAD24* опосредуют процесс распознавания повреждений и ранние этапы их устранения [4]. Протеинкиназа *RAD53* участвует в киназном каскаде передачи сигнала, а активность другой киназы, *CDC28*, играет существенную роль на завершающих этапах механизма обратной связи, который задерживает смену фаз клеточного цикла. Действие гена *RAD53* способно приводить к ингибированию активности киназы *CDC5*, которая необходима для деградации циклинов, регуляторных субъединиц киназы *CDC28* [5]. Поддерживая высокую активность циклинзависимой протеинкиназы *CDC28*, *RAD53* задерживает события, запускаемые при исчезновении активности *CDC28* (например, выход клеток из митоза и завершение цикла деления). Эту задержку, возникающую в ответ на повреждения ДНК, снимают мутации как в гене *RAD53*, так и в гене *CDC28*, а также мутации в генах *RAD9* и *RAD24*, нарушающие распознавание повреждений ДНК.

Мутации перечисленных 4 генов, вовлеченных в один общий механизм checkpoint-контроля/определения радиочувствительности клеток, при их фенотипическом проявлении должны, очевидно, маскировать присутствие друг друга (эпистаз). Мутации, полностью инактивирующие гены *RAD53* и *CDC28*, летальны. Поэтому следует ожидать, что мутации *rad9Δ* и *rad24Δ*, полностью блокирующие функции соответствующих генов, будут эпистатичны по отношению к нелетальным (leaky) мутациям *rad53* и *cdc28* (а последние, соответственно, гипостатичны по отношению к *rad9Δ* и *rad24Δ*). Взаимодействие мутаций *rad53* и *cdc28*, которые у

жизнеспособных клеток блокируют функции соответствующих генов не полностью, не обязательно должно носить характер эпистаза, возможен аддитивный или даже синергический эффект. Вместе с тем радиочувствительность двойных мутантов *rad53 cdc28* не должна, вероятно, быть выше радиочувствительности клеток с эпистатичной мутацией *rad9Δ* или *rad24Δ*. Как будет видно из дальнейшего, приведенные предположения, основанные на современных моделях checkpoint-контроля [6], в опыте подтверждаются лишь отчасти. Мутации *rad9Δ* и *rad24Δ* действительно эпистатичны по отношению к каждой из мутаций *cdc28* и *rad53*. Однако радиочувствительность двойных мутантов *rad53 cdc28* оказывается выше радиочувствительности мутантов *rad9Δ* или *rad24Δ*. Этот результат указывает (по-видимому, впервые) на существование иного, зависящего от генов *CDC28* и *RAD53*, но *RAD9*-независимого, механизма определения радиочувствительности клеток

Проведя скрещивания исходных линий, несущих мутации checkpoint-генов, с изогенными друг другу линиями 71a или 71α [7] и ряд последовательных бэккроссов потомства этих скрещиваний с родителями 71a и 71α, мы сконструировали близкородственные диплоидные штаммы, несущие в гомозиготном состоянии мутации генов *RAD9*, *RAD24*, *RAD53* и *CDC28* поодиночке и в парных сочетаниях. Источниками мутаций *rad9*, *rad24* и *rad53* служили, соответственно, штамм 7859-7-4a (*MATa rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7*), предоставленный проф. L.H. Hartwell (University of Washington, Seattle), и штаммы SX46a *rad24Δ* (*MATa rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*) и CRY1 (*MATa sad1-1 (=rad53) ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100*), любезно предоставленные проф. W. Siede (University of Texas, Dallas). Мутация *cdc28-srm* получена нами [7], она вызывает в аминокислотной последовательности белка Cdc28p замену G20S и, по сравнению с другими мутациями *cdc28*, сопровождается более сильным повышением радиочувствительности клеток [8]. Чувствительность к γ -излучению определяли для групп линий с одинаковыми генотипами (по 3 линии в каждой группе).

Для облучения суспензий стационарных культур, содержащих 10^3 - 10^6 дрожжевых клеток в 1 мл, использовали γ -источник ^{137}Cs (мощность дозы 25 Гр/мин). Необлученные суспензии, служившие контролем, и облученные суспензии рассевали на полноценную питательную среду БС (0,5% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 2% агара) в разведениях, дававших приблизительно 100 колоний на чашку. Подсчет колоний для определения выживаемости производили после инкубации посевов при 30°C в течение 5 суток. Кривые выживания изученных линий после γ -облучения, приведенные на рис. 1 - 3, соответствуют усредненным данным для соответствующих групп линий с одинаковыми генотипами.

Ранее анализ радиочувствительности одиночных и двойных мутантов показал, что мутация *rad9Δ* эпистатична по отношению к мутации *cdc28-srm*; на этом основании нами было высказано предположение об участии гена *CDC28* в checkpoint-контроле и о повышении радиочувствительности клеток *cdc28-srm* как следствии мутационного нарушения checkpoint-контроля [8]. В подтверждение этого предположения эпистатичной по отношению к *cdc28-srm* оказалась и мутация *rad24Δ*: радиочувствительность двойных мутантов *cdc28-srm rad24Δ* совпадает с радиочувствительностью наиболее чувствительного из одиночных мутантов - *rad24Δ* (рис. 1).

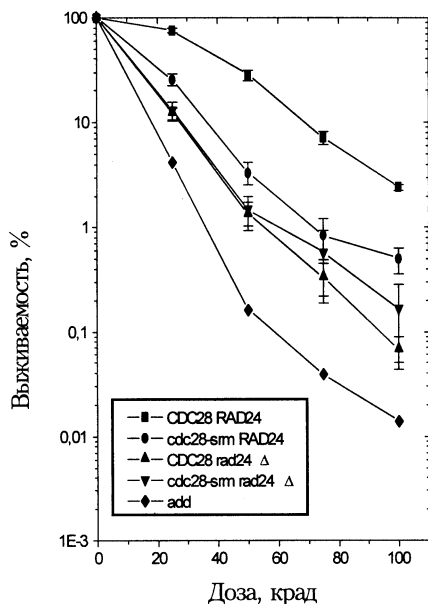


Рисунок 1. Кривые выживания после γ -облучения диплоидов гомо- и гетерозиготных по мутациям *cdc28-srm* и *rad24* Δ . Кривые соответствуют результатам усреднения экспериментальных значений радиочувствительности клеток, полученных в каждом случае для 3 штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток.

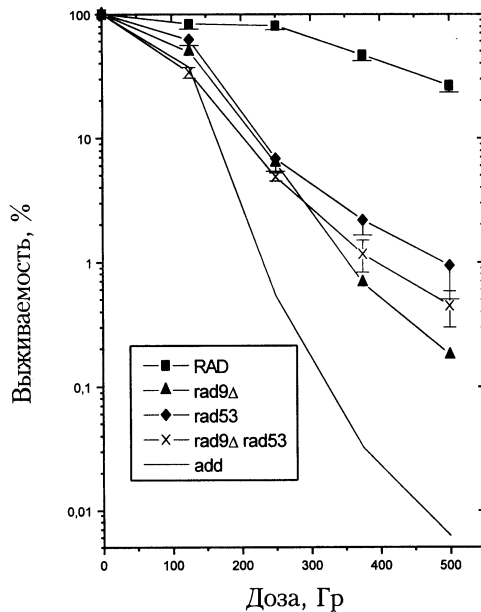


Рисунок 2. Кривые выживания после γ -облучения диплоидов гомо- и гетерозиготных по мутациям *rad9 Δ* и *rad53*. Кривые соответствуют результатам усреднения экспериментальных значений радиочувствительности клеток, полученных в каждом случае для 3 штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток.

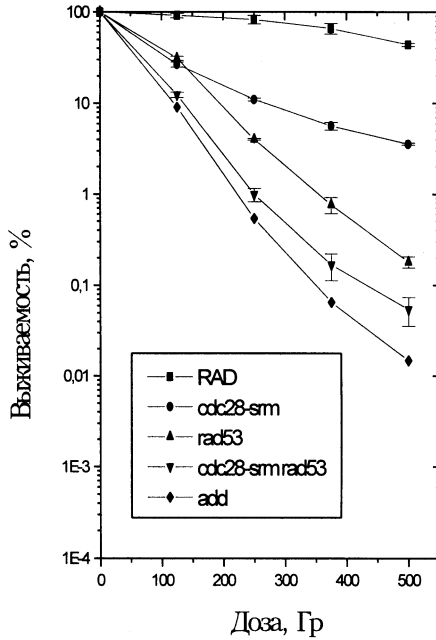


Рисунок 3. Кривые выживания после γ -облучения диплоидов гомо- и гетерозиготных по мутациям *cdc28-srm* и *rad53*. Кривые соответствуют результатам усреднения экспериментальных значений радиочувствительности клеток, полученных в каждом случае для 3 штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток.

У двойных мутантов *rad9Δ rad53* радиочувствительность так же не выше, чем у каждого из соответствующих одиночных мутантов (рис. 2). Этот результат согласуется с некоторыми молекулярно-биологическими данными [9-11]. Показано, что в ответ на повреждения ДНК (но не ингибирование репликации) белок Rad9p фосфорилируется и взаимодействует с С-концевым доменом белка Rad53p. Это взаимодействие необходимо для фосфорилирования белка Rad53p, индуцированного повреждениями ДНК, останки в G2/M и транскрипционного ответа. Вместе с тем приведенные данные о взаимодействии белков Rad9p и Rad53p не позволяют с уверенностью делать универсальные прогнозы относительно взаимодействия мутаций *rad9* и *rad53*: например, эффекты *rad9Δ* и *rad53* в отношении чувствительности клеток к MMS аддитивны [12].

Неожиданный результат получен при анализе взаимодействия между мутациями *cdc28-srm* и *rad53*. Совместное влияние этих мутаций на радиочувствительность клеток характеризуется аддитивностью эффектов отдельных мутаций (рис. 3). При этом, во-первых, можно с определенностью утверждать, что ни одна из рассматриваемых двух мутаций не является эпистатичной по отношению к другой, и, во-вторых, сочетание мутаций *cdc28-srm rad53* определяет заметно более высокую радиочувствительность клеток по сравнению с одиночной мутацией *rad9Δ*, которая эпистатична по отношению к каждой из мутаций *cdc28-srm* и *rad53*.

Возможно, *RAD9*-независимый механизм оказывает влияние на радиочувствительность клеток и обеспечивается протеинкиназами *CDC28* и *RAD53*, фосфорилирующими общий субстрат, в результате чего достигается аддитивность эффектов мутаций *cdc28-srm* и *rad53*.

Несомненно, участие checkpoint-генов в определении чувствительности клеток к повреждающим агентам выходит за рамки роли этих генов в checkpoint-регуляции. В пользу такого заключения свидетельствуют, например, невозможность полностью снять повышение чувствительности к повреждающим агентам у мутантов *S. cerevisiae rad9* [1, 13], *rad53* [14] и *mec1* [15] за счет специально вызванной дополнительной задержки клеточного цикла. Отметим также, что у мутантных клеток *chk1* затронута способность останавливать клеточный цикл на границе G2/M в ответ на индуцированные повреждения ДНК, но не изменена чувствительность к летальным эффектам этих повреждений [5]. Мутант по гену геликазы *SGS1*, у которого затронут S/M-checkpoint, не обнаруживает повышенной чувствительности к γ - и УФ-излучению [16]. В ряде случаев повышение радиочувствительности у мутантов *S. cerevisiae* по checkpoint-генам не удается полностью объяснить нарушениями собственно checkpoint-контроля. Возможно, соответствующие мутации также препятствуют активации репарационной системы и/или оптимальной доставке ее компонентов к сайту повреждения ДНК [4]. Роль checkpoint-генов в механизмах, определяющих чувствительность клеток к ДНК-тропным агентам, в частности, в механизмах репарации ДНК, представляется заслуживающей дальнейшего анализа.

Авторы приносят благодарность академику Е.Д. Свердлову, чл.-корр. РАН В.А. Гвоздеву и И.П. Арман за критическое прочтение рукописи, В.Г. Королеву и А. Aboussekhra за плодотворное обсуждение данных, А. Герасимовой за секвенирование последовательности мутантного гена *cdc28-srm*, М.П. Рощиной, Ю.В. Никулушкиной и Т.Н. Базловой - за помощь в экспериментах.

Работа выполнена частично на средства РФФИ (проект No. 01-04-49114).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weinert T.A., Hartwell L.H.* // *Science*. 1988. V. 241. P. 317-322.
2. *Morgan S.E., Kastan M.B.* // *Adv. Cancer Res.* 1997. V. 71. P. 1-25.
3. *Weinert T.A., Hartwell L.H.* // *Mol. Cell. Biol.* 1990. V. 10. P. 6554-6564
4. *Longhese M.P. et al.* // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 5525-5528.
5. *Sanchez Y. et al.* // *Science*. 1999. V. 286. P. 1166-1171.
6. *Lowndes N.F., Murguia J.R.* // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000 V. 10. P. 17-25.
7. *Devin A.B. et al.* // *Yeast*. 1990. V. 6. P. 231-243.
8. *Koltovaya N.A. et al.* // *Yeast*. 1998. V. 14. P. 133-146.
9. *de la Torre-Ruiz M.-A. et al.* // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 2687-2698.
10. *Navas T.A. et al.* // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 2632-2643.
11. *Sun Z. et al.* // *Science*. 1998. V. 281. P. 272-274.
12. *Paulovich A.G. et al.* // *Genetics*. 1997. V. 145. P. 45-62.
13. *Aboussekhra A. et al.* // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 3912-3922.
14. *Allen J.B. et al.* // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 2401-2415.
15. *Bashkirov V.I. et al.* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 4393-44054.
16. *Frei C., Gasser S.M.* // *Genes Dev.* 2000. V. 14. P. 81-96.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 декабря 2001 года.

Колтовая Н. А., Девин А. Б.

P19-2001-284

О роли некоторых checkpoint-генов в определении радиочувствительности дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*

Анализ влияния мутаций *rad53* и *cdc28-srm* на чувствительность клеток *Saccharomyces cerevisiae* к летальному действию γ -облучения показал, что эти мутации усиливают действие друг друга. Мутации *rad9 Δ* и *rad24 Δ* эпистатичны по отношению к каждой из мутаций *rad53* и *cdc28-srm*. Однако двойные мутанты *cdc28-srm rad53* обнаруживают более высокую радиочувствительность по сравнению с мутантами *rad9 Δ* или *rad24 Δ* . Этот результат не согласуется с современными моделями, связывающими изменения радиочувствительности с нарушениями checkpoint-регуляции клеточного цикла. Полученные данные указывают на существование генетического механизма определения радиочувствительности дрожжевых клеток, в котором участвуют гены *CDC28* и *RAD53* и не участвует ген *RAD9*.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2001

Перевод авторов

Koltovaya N. A., Devin A. B.

P19-2001-284

Concerning the Role of Some Checkpoint Genes in Determining the Radiation Sensitivity of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

In *Saccharomyces cerevisiae* the *rad53* and *cdc28-srm* mutations have been found to increase the effects of each other as regards cell sensitivity to gamma radiation. Mutations *rad9 Δ* and *rad24 Δ* are epistatic to each of *rad53* and *cdc28-srm*. However double *cdc28-srm rad53* mutants are more sensitive to gamma rays as compared with *rad9 Δ* or *rad24 Δ* mutants. This result is at variance with current genetic models explaining changes in cell radiation sensitivity with checkpoint control disorders. Our data suggest a new genetic mechanism involved in determining the cell radiation sensitivity and mediated by the *CDC28* and *RAD53* genes and not *RAD9*.

The investigation has been performed at the Division of Radiation and Radiobiological Research, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2001

Редактор М. И. Зарубина. Макет Н. А. Киселевой

Подписано в печать 04.03.2002
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. л. 0,7
Тираж 230. Заказ 53152. Цена 70 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области