

P19-2007-125

Н. А. Колтовая<sup>1</sup>, Ю. В. Никулушкина, М. П. Рощина<sup>2</sup>,  
А. Б. Девин<sup>2</sup>

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЧЕКПОЙНТ-ГЕНОВ *RAD9*,  
*RAD17*, *RAD24* И *RAD53* В ОПРЕДЕЛЕНИИ  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДРОЖЖЕЙ  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К ДЕЙСТВИЮ  
ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ

Направлено в журнал «Генетика»

---

<sup>1</sup>E-mail: koltovaya@jinr.ru

<sup>2</sup>Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва

Колтовая Н. А. и др.

P19-2007-125

Взаимодействие чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53*  
в определении чувствительности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*  
к действию ионизирующей радиации

Механизмы генетического контроля прохождения цикла деления клетки (чекпойнт-контроль) изучены наиболее полно у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для выявления роли чекпойнт-генов *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* в радиорезистентности клеток мы анализировали чувствительность двойных мутантов к ионизирующей радиации. Показан эпистатический характер взаимодействия для двойных мутантов, несущих мутации в комбинации с мутацией *rad9Δ*, т.е. чувствительность двойных мутантов к  $\gamma$ -излучению не больше, чем у наиболее чувствительного из одиночных мутантов. Полученные данные позволяют предположить, что чекпойнт-гены *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* образуют единую эпистатическую группу, которую обозначили как *RAD9*-группу, и они регулируют один и тот же путь. Причем гены *RAD9* и *RAD53* производят позитивный, а гены *RAD17* и *RAD24* — негативный эффект на чувствительность к  $\gamma$ -излучению. В отношении чувствительности к воздействию  $\gamma$ -лучей и УФ-света взаимодействие мутаций может отличаться, например, для мутаций *rad9Δ* и *rad24Δ* наблюдается аддитивность в первом случае и эпистаз во втором случае.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2007

Koltovaya N. A. et al.

P19-2007-125

Interactions of Checkpoint-Genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* and *RAD53*  
Determining Radioresistance of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

The mechanisms of genetic control of progress through the division cell cycle (checkpoint-control) in yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been studied intensively. To investigate the role of checkpoint-genes *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* in cell radioresistance we have investigated cell sensitivity of double mutants to  $\gamma$ -ray. Double mutants involving various combinations with *rad9Δ* show epistatic interactions, i.e. the sensitivity of the double mutants to  $\gamma$ -ray was no greater than that of more sensitive of the two single mutants. This suggests that all these genes govern the same pathway. This group of genes was named *RAD9*-epistasis group. It is interesting to note that genes *RAD9* and *RAD53* have positive effect but *RAD17* and *RAD24* have negative effect on radiosensitivity of yeast cells. Interactions between mutations may differ depending on the agent  $\gamma$ -ray or UV-light, for example mutations *rad9Δ* and *rad24Δ* show additive effect for  $\gamma$ -ray and epistatic effect for UV-light.

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

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

Толерантность эукариотических клеток к повреждениям хромосомной ДНК обеспечивают механизмы и процессы узнавания и репарации повреждений, репликации и транскрипции генетического материала, реконструкции хроматина и сегрегации хромосом. Дрожжи-сахаромицеты применимы в качестве модели для облегчения анализа различных консервативных механизмов, действующих в клетках высших эукариот. Именно у дрожжей были первоначально идентифицированы и охарактеризованы гены, функциональные гомологи которых у человека ассоциированы с определенными заболеваниями или необходимы для репарации радиационных повреждений ДНК [1–3]. Возможность полномасштабного анализа изменений экспрессии генома в ответ на изменения окружающей среды [4, 5] и, в частности, на действие различных ДНК-повреждающих агентов [6], существенно расширяет возможности использования дрожжей в качестве модельного организма. У дрожжей известны три так называемые эпистатические группы генов радиочувствительности, а именно группы *RAD6*, *RAD3* и *RAD52* [7]. Гены этих групп опосредуют различные типы репарации, в частности механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных ионизирующим излучением, на основе гомологичной рекомбинации (HR) (в том числе механизмы межсестринской и межхромосомной рекомбинации, индуцированной разрывами репликации (BIR), и одноцепочечное соединение, или однострессовой отжиг (SSA)) и незаконной рекомбинации (в том числе нехомологичное соединение концов (NHEJ)) [8, 9].

Радиочувствительность клеток опосредует также специфический регуляторный механизм с использованием сверхточных точек в клеточном цикле, так называемый чекпойнт-контроль [10, 11]. Генетический контроль остановки деления клеток наиболее изучен для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [12, 11]. Опубликованные данные, в основном, касаются остановки деления и радиочувствительности после облучения клеток УФ-светом [13, 14]. Взаимодействия с участием чекпойнт-генов, модулирующие  $\gamma$ -чувствительность дрожжей, исследованы далеко не полностью [15]. Взаимодействия генов собственно репарации и генов чекпойнт-контроля и роль этих генных взаимодействий в определении радиочувствительности клеток также исследованы недостаточно [10]. В настоящей работе анализировали влияние парных сочетаний мутаций чекпойнт-генов на чувствительность дрожжей к повреждающему действию ионизирующей радиации. Из полученных данных следует, что гены *RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *RAD53* образуют эпистатическую группу,

которой, по-видимому, соответствует единый основной *RAD9*-зависимый механизм радиорезистентности. Изученные гены могут участвовать также в минорных механизмах радиорезистентности, относительно независимых от упомянутого основного механизма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Штаммы Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе (табл. 1), являются близкородственными и сконструированы введением перечисленных ниже мутаций в генотип изогенных родительских штаммов. Мутации вводили посредством скрещивания штаммов-источников с родительскими штаммами 71а или 71α [16], получения полового потомства и неоднократных (не менее трех) последовательных бэккроссов с 71а или 71α. Источниками мутаций *rad9Δ*, *rad17Δ*, *rad24Δ* и *rad53* служили штаммы 7859-7-4а (*MATa rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7*), SX46A *rad24Δ* (*MATa rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*), SX46 *rad17Δ* (*MATa rad17::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52*) и CRY1 (*MATa sad1-1 (=rad53) ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100*). Первый из этих штаммов получен от проф. Л. Хартуэлла (Вашингтонский университет, Сиэтл), прочие предоставлены проф. У. Зиде (Техасский университет, Даллас).

*Среды и реактивы.* Использовали стандартную полную питательную среду YEPD [17] и среды БС, PMG, SMK, описанные ранее [18].

*Тетрадный анализ.* Культуры диплоидных гибридов выращивали в течение суток на предспоруляционной среде PMG и затем переносили на споруляционную среду SMK. Спустя 3–5 сут инкубации при комнатной температуре аскоспоры изолировали с помощью микроманипулятора на агаризованном блоке среды БС и инкубировали в течение 4 сут при 30°C.

*γ-облучение.* Водные суспензии ( $10^3 - 10^5$  кл./мл) 7-суточных стационарных культур, выросших на агаризованной среде БС, облучали во льду на установке «Свет» ( $^{137}\text{Cs}$ , 25 Гр/мин) Объединенного института ядерных исследований (Дубна). В особо указанных случаях облучение проводили на γ-установке «Материаловедческая» ( $^{60}\text{Co}$ , 180 Гр/мин) «Курчатовского института» ГУ Федерального научного центра (Москва). Контрольные и облученные суспензии рассеивали на чашки со средой БС из расчета 100 жизнеспособных клеток на чашку и инкубировали 5–7 сут при 30°C.

*УФ-облучение.* Ночные культуры дрожжей, выращенные в жидкой YEPD при 30° С, отмывали от среды, разводили в воде, наносили на поверхность агаризованной среды БС (100 жизнеспособных клеток на чашку) и облучали в темноте УФ-светом (мощность дозы 0,3 Дж/м<sup>2</sup> с). Облученные чашки помещали на сутки в металлический пенал во избежание фотореактивации и вместе с контрольными чашками инкубировали в течение 5–7 сут при 30° С.

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник или происхождение
7859-7-4a	<i>MATa rad9::LEU2 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 his7</i>	L.H.Hartwell (University of Washington, Seattle)
SX46A rad24Δ	<i>MATa rad24::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>	W.Siede (University of Texas, Dallas)
SX46A rad17Δ	<i>MATa rad17::URA3 ade2 his3-532 trp1-289 ura3-52</i>	"
CRY1	<i>MATa rad53 (=sad1-1) ade2-1 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100</i>	"
71a	<i>MATa SRM+ ade1</i>	Сконструирован авторами [18]
71α	<i>MATα SRM+ ade1</i>	"
Серия 9/17:		Сконструированы авторами в данной работе
9/+ 17/+ (1-4)	<i>MATa/MATα RAD9/rad9::LEU2 RAD17/rad17::URA3</i>	"
9/+ 17/17 (1-3)	<i>MATa/MATα RAD9/rad9::LEU2 rad17::URA3/rad17::URA3</i>	"
9/9 17/+ (1-4)	<i>MATa/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 RAD17/rad17::URA3</i>	"
9/9 17/17 (1-4)	<i>MATa/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 rad17::URA3/rad17::URA3</i>	"
Серия 9/24:		"
9/+ 24/+ (1-2)	<i>MATa/MATα RAD9/rad9::LEU2 RAD24/rad24::URA3</i>	"
9/+ 24/24 (1-3)	<i>MATa/MATα RAD9/rad9::LEU2 rad24::URA3/rad24::URA3</i>	"
9/9 24/+ (1-3)	<i>MATa/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 RAD24/rad24::URA3</i>	"
9/9 24/24 (1-4)	<i>MATa/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 rad24::URA3/rad24::URA3</i>	"
+ (1-4)	<i>RAD+ ade2</i>	"
9 (1-4))	<i>rad9::LEU2 ade2</i>	"
24 (1-4)	<i>rad24::URA3 ade2</i>	"
9,24 (1-4)	<i>rad9::LEU2 rad24::URA3 ade2</i>	"

Продолжение таблицы

Штамм	Генотип	Происхождение штаммов
Серия 9/53:		
9/+ 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα RAD9/rad9::LEU2 RAD53/rad53</i>	“
9/+ 53/53 (1-4)	<i>MATα/MATα RAD9/rad9::LEU2 rad53/rad53</i>	“
9/9 53/+ (1-4)	<i>MATα/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 RAD53/rad53</i>	“
9/9 53/53 (1-4)	<i>MATα/MATα rad9::LEU2/rad9::LEU2 rad53/rad53</i>	“
Серия 17/24:		
17/+ 24/+ (1-2,)	<i>MATα/MATα RAD17/rad17::URA3 RAD24/rad24::URA3</i>	“
17/+ 24/24 (1-4)	<i>MATα/MATα RAD17/rad17::URA3 rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
17/17 24/+ (1-4)	<i>MATα/MATα rad17::URA3/rad17::URA3 RAD24/rad24::URA3</i>	“
17/17 24/24 (1-4)	<i>MATα/MATα rad17::URA3/rad17::URA3 rad24::URA3/rad24::URA3</i>	“
Серия 17/53		
17/+ 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα RAD17/rad17::URA3 RAD53/rad53</i>	“
17/17 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα rad17::URA3/rad17::URA3 RAD53/rad53</i>	“
17/+ 53/53 (1-3)	<i>MATα/MATα RAD17/rad17::URA3 rad53/rad53</i>	“
17/17 53/53 (1-3)	<i>MATα/MATα rad17::URA3/rad17::URA3 rad53/rad53</i>	“
Серия 24/53:		
24/+ 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα RAD24/rad24::URA3 RAD53/rad53</i>	“
24/24 53/+ (1-3)	<i>MATα/MATα rad24::URA3/rad24::URA3 RAD53/rad53</i>	“
24/+ 53/53 (1-3)	<i>MATα/MATα RAD24/rad24::URA3 rad53/rad53</i>	“
24/24 53/53 (1-3)	<i>MATα/MATα rad24::URA3/rad24::URA3 rad53/rad53</i>	“

\* Центр генетических культур дрожжей в Беркли, США (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, USA).

Значения точек теоретической кривой, описывающей аддитивность эффектов мутаций радиочувствительности, вычисляли по формуле  $lgS_{add} = lgS_1 + lgS_2 - lgS_{wt}$ , где  $S_1$  и  $S_2$  — значения выживаемости одиночных мутантов и  $S_{wt}$  — выживаемость дикого типа соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ изменений радиочувствительности клеток при взаимодействии мутаций  $rad9\Delta$ ,  $rad17\Delta$  и  $rad24\Delta$ .** При анализе попарных взаимодействий между мутациями  $rad9\Delta$ ,  $rad17\Delta$  и  $rad24\Delta$  использовали серии специально сконструированных одиночных и двойных мутантов, а также немутантных штаммов (каждая серия состояла из 2–4 независимо полученных близкородственных штаммов с одинаковым генотипом) и определяли чувствительность клеток полученных штаммов к  $\gamma$ -излучению. При оценке характера взаимодействия между мутациями использовали также теоретическую кривую, описывающую аддитивность эффектов двух мутаций.

Усредненные кривые выживаемости для серий немутантных штаммов  $RAD9/rad9\Delta$   $RAD17/rad17\Delta$  (4 штамма), одиночных мутантов  $rad9\Delta/rad9\Delta$   $rad17\Delta/RAD17$  (4 штамма),  $rad9\Delta/RAD9$   $rad17\Delta/rad17\Delta$  (3 штамма) и двойных мутантов  $rad9\Delta/rad9\Delta$   $rad17\Delta/rad17\Delta$  (4 штамма) показывают, что у двойных мутантов  $\gamma$ -чувствительность в среднем несколько ниже, нежели у наиболее радиочувствительных одиночных мутантов  $rad9\Delta/rad9\Delta$  и совпадает с радиочувствительностью второй группы одиночных мутантов  $rad17\Delta/rad17\Delta$  (рис. 1, а). Эти данные показывают, что гены  $RAD9$  и  $RAD17$ , скорее всего, нельзя отнести к различным группам эпистаза. В то же время едва ли можно считать, что мутации в обоих генах блокируют один и тот же механизм определения радиочувствительности, которому соответствует неразветвленная последовательность генных функций. Компенсаторный эффект, обнаруженный при определении радиочувствительности двойных мутантов, возможно, указывает на разветвленность соответствующего механизма.

Усредненные кривые выживаемости для серий немутантных штаммов  $RAD17/rad17\Delta$   $RAD24/rad24$  (2 штамма), одиночных мутантов  $rad17\Delta/rad17\Delta$   $rad24\Delta/RAD24$  (4 штамма),  $rad17\Delta/RAD17$   $rad24\Delta/rad24\Delta$  (4 штамма) и  $rad17\Delta/rad17\Delta$   $rad24\Delta/rad24\Delta$  (4 штамма) показывают, что  $\gamma$ -чувствительность двойных мутантов в среднем не выше чувствительности одиночных мутантов (рис. 1, б). Эти данные позволяют отнести гены  $RAD17$  и  $RAD24$  к одной и той же группе эпистаза.

Наконец, в опытах с сериями штаммов, немутантных и мутантных по генам  $RAD9$  и  $RAD24$ , получены кривые выживаемости (рис. 2, а), показывающие, что мутанты  $rad9\Delta/rad9\Delta$  более чувствительны к  $\gamma$ -излучению по сравнению с двойными мутантами  $rad9\Delta/rad9\Delta$   $rad24\Delta/rad24\Delta$ , которые в

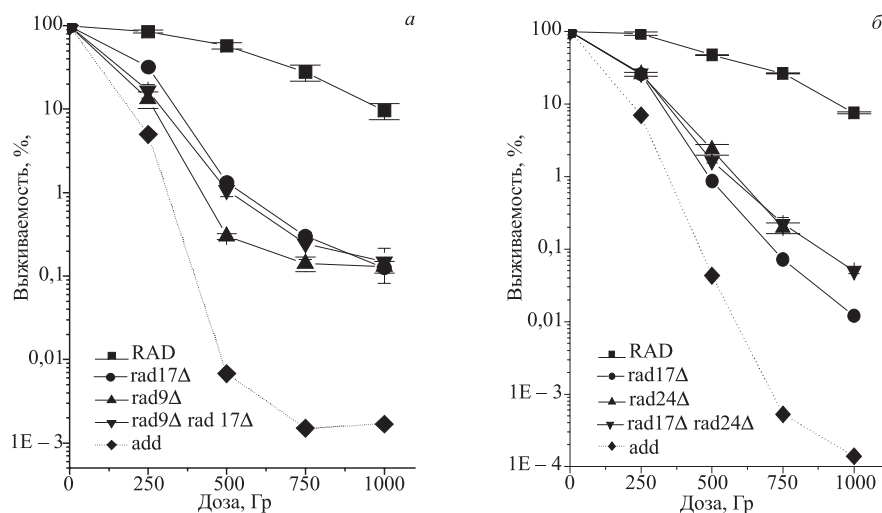


Рис. 1. Кривые выживания после  $\gamma$ -облучения диплоидных одиночных и двойных мутантов, гомозиготных по мутациям *rad9* $\Delta$  и *rad17* $\Delta$  (а), *rad17* $\Delta$  и *rad24* $\Delta$  (б). Каждая кривая соответствует усредненным данным для трех-четырех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

свою очередь более  $\gamma$ -чувствительны по сравнению с одиночными мутантами *rad24* $\Delta$ /*rad24* $\Delta$ . Сходным образом ведут себя кривые выживаемости тех же штаммов после УФ-облучения (рис. 2, в). Эти данные показывают, что гены *RAD9* и *RAD24* относятся к одной группе эпистаза. Как и в случае генов *RAD9* и *RAD17*, наблюдается компенсаторный эффект.

Полученные данные противоречат данным литературы об аддитивном действии мутаций *rad9* $\Delta$  и *rad24* $\Delta$  в отношении чувствительности к летальному действию УФ-света и ММС [19, 20]. Можно предположить, что тип взаимодействия между мутациями зависит от пloidности и стадии клеточного цикла, поскольку в этих работах для облучения использовали ночные культуры гаплоидных штаммов дрожжей. Для проверки этого предположения сконструировали гаплоидную серию штаммов, немутантных и мутантных по генам *RAD9* и *RAD24* (см. таблицу). На рис. 2, б представлены кривые выживания гаплоидных штаммов при  $\gamma$ -облучении стационарных культур. Действительно, у гаплоидных штаммов мутант *rad9* $\Delta$  также более чувствителен, чем мутант *rad24* $\Delta$ , причем радиочувствительность двойного мутанта *rad9* $\Delta$  *rad24* $\Delta$  соответствует аддитивному эффекту мутаций, согласно полученным ранее данным [21]. При облучении УФ-светом гаплоидных штаммов в стац-



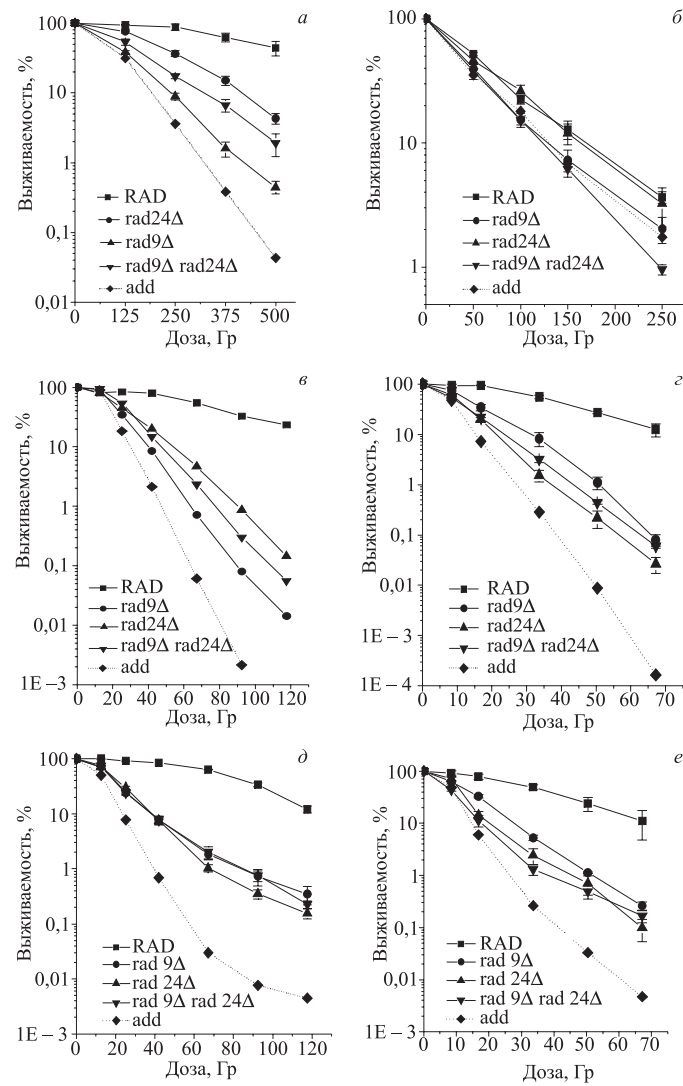


Рис. 2. Кривые выживаемости при  $\gamma$ -облучении (а, б) и УФ-облучении (в-е) диплоидных (а, в, д) и гаплоидных (б, г, е) одиночных и двойных мутантов *rad9Δ* и *rad24Δ* в стационарной (а-г) и логарифмической (д, е) фазах роста. Каждая кривая соответствует усредненным данным для четырех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

онарной фазе роста (рис. 2, *г*) мутант *rad9* $\Delta$  менее чувствителен, чем мутант *rad24* $\Delta$ , а УФ-чувствительность двойного мутанта занимает промежуточное положение, так же, как и в случае с диплоидными штаммами (рис. 2, *в*). Однако в логарифмической стадии роста чувствительность к УФ-свету у гаплоидного двойного мутанта выше, чем у одиночного мутанта *rad24* $\Delta$ , но ниже, чем при аддитивном эффекте (рис. 2, *е*), т. е. наблюдается эпистатический эффект мутаций *rad9* $\Delta$  и *rad24* $\Delta$ , что соответствует полученным ранее данным [21]. Для диплоидных клеток в экспоненциальной фазе роста УФ-чувствительность одиночных и двойного мутантов практически одинакова (рис. 2, *д*).

Таким образом, для диплоидных штаммов в отношении чувствительности к ионизирующему излучению мутации в генах *RAD9* и *RAD24* относятся к одной эпистатической группе, по-видимому, эти гены относятся к одному пути, определяющему чувствительность дрожжевых клеток к  $\gamma$ -облучению, хотя их действие противоположно направлено. Разрушение гена *RAD24* приводит к снижению влияния мутации *rad9* $\Delta$  на радиочувствительность клеток. В отношении чувствительности к воздействию  $\gamma$ -лучей и УФ-света взаимодействие мутаций у гаплоидных штаммов может отличаться в зависимости от фазы роста, в экспоненциальной фазе роста наблюдается эпистаз, а в стационарной фазе роста — аддитивность и эпистаз, соответственно.

**Анализ изменений радиочувствительности клеток при взаимодействии мутации *rad53* с мутациями *rad9* $\Delta$ , *rad17* $\Delta$ , *rad24* $\Delta$ .** Усредненные кривые выживаемости для серий немутантных штаммов *RAD9/rad9* $\Delta$  *RAD53/rad53* (3 штамма), одиночных мутантов *rad9* $\Delta$ /*rad9* $\Delta$  *rad53/RAD53* (4 штамма), *rad9* $\Delta$ /*RAD9* *rad53/rad53* (4 штамма) и двойных мутантов *rad9* $\Delta$ /*rad9* $\Delta$  *rad53/rad53* (4 штамма) показывают, что у двойных мутантов  $\gamma$ -чувствительность в среднем не выше, нежели у наиболее  $\gamma$ -чувствительных из одиночных мутантов, а именно у мутантов *rad9* $\Delta$ /*rad9* $\Delta$  (рис. 3, *а*). На основании этих данных гены *RAD9* и *RAD53* можно отнести к одной и той же группе эпистаза.

Усредненные кривые выживаемости для серий немутантных штаммов *RAD17/rad17* $\Delta$  *RAD53/rad53*, одиночных мутантов *rad17* $\Delta$ /*rad17* $\Delta$  *rad53/RAD53*, *rad17* $\Delta$ /*RAD17* *rad53/rad53* и двойных мутантов *rad17* $\Delta$ /*rad17* $\Delta$  *rad53/rad53* (по 3 штамма в каждой серии облучали на установке «Материаловедческая») показывают, что у двойных мутантов  $\gamma$ -чувствительность в среднем близка к чувствительности одиночных мутантов (рис. 3, *б*). По-видимому, ген *RAD17*, как и *RAD9*, попадает в одну группу эпистаза с *RAD53*.

Усредненные кривые выживаемости для серий немутантных штаммов *RAD24/rad24* $\Delta$  *RAD53/rad53*, одиночных мутантов *rad24* $\Delta$ /*rad24* $\Delta$  *rad53/RAD53*, *rad24* $\Delta$ /*RAD24* *rad53/rad53* и двойных мутантов *rad24* $\Delta$ /*rad24* $\Delta$  *rad53/rad53* (по 3 штамма в каждой серии) показывают, что, как и в предыдущем случае, у двойных мутантов  $\gamma$ -чувствительность в среднем близка к чувствительности одиночных мутантов (рис. 3, *б*). По-видимому, ген *RAD24*, подобно

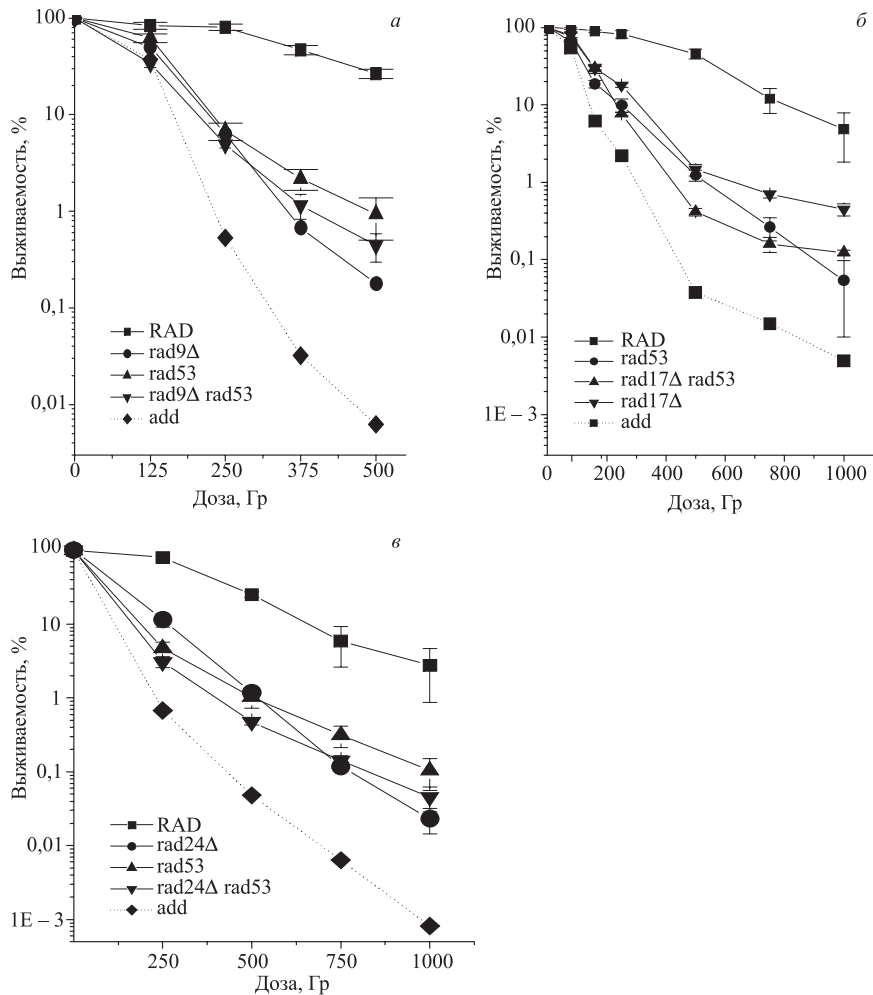


Рис. 3. Кривые выживаемости при  $\gamma$ -облучении (*а, в* — Cs, *б* — Co) диплоидных одиночных и двойных мутантов *rad53* и *rad9Δ* (*а*), *rad53* и *rad17Δ* (*б*), *rad24Δ* и *rad53*. Каждая кривая соответствует усредненным данным для трех-четырех штаммов одинакового генотипа; показаны среднеквадратичные ошибки. Для сравнения дана кривая, ожидаемая при аддитивности влияния двух мутаций на радиочувствительность клеток

генам *RAD9* и *RAD17*, попадает в одну группу эпистаза с геном *RAD53*. О вхождении генов *RAD24* и *RAD53* в общую группу эпистаза говорят и данные, полученные при анализе других признаков [22, 23].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическому контролю чувствительности дрожжей к ионизирующей радиации посвящены многочисленные исследования [7]. Определены эпистатические группы генов, соответствующие различным путям репарации двуни-тевых разрывов ДНК (ДНР ДНК). Выделена большая группа генов, кон-тролирующая остановку клеточного цикла при повреждении ДНК и уве-личивающая емкость репарации [24]. В данной работе проводится анализ эпистатических взаимодействий мутаций чекпойнт-генов в отношении радио-чувствительности.

Результаты проведенного исследования группы генов чувствительности к ионизирующей радиации позволяют отнести чекпойнт-гены *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* и *RAD53* к одной и той же эпистатической группе, которой можно по-ставить в соответствие *RAD9*-зависимый путь определения радиорезистентно-сти. Однако эти взаимодействия не согласуются со схемой чекпойнт-контроля, полученной при изучении действия различных повреждающих агентов [25]. В регуляции чекпойнт-контроля гены *RAD9* и *RAD17/RAD24* аддитивны, а гены *RAD9* и *RAD53* эпистатичны [23, 26]. Можно предположить, что пути активации и реализации чекпойнт-регуляции отличаются для разных повре-ждающих агентов и/или влияние чекпойнт-генов на радиочувствительность обусловлено не только регуляцией остановки клеточного цикла, но и уча-стием генов в других процессах, например таких как индукция транскрипции репарационных генов [23, 27] и посттранскрипционная регуляция некоторых путей репарации.

Продолжительное пострадиационное выдерживание в точке клеточного цикла G2/M приводит к повышению выживаемости  $\gamma$ -облученных гаплоид-ных клеток *rad9* $\Delta$  до уровня, который характерен для клеток дикого типа, облученных в той же дозе [27]. Аналогичный результат получен при рент-геновском облучении клеток [28]. Эти данные позволяют предполагать, что *RAD9*-зависимая остановка клеточного цикла в сверочной точке, которую ин-дуцируют повреждения ДНК при  $\gamma$ - и X-облучении, просто дает дополнитель-ное время для завершения репарации упомянутых повреждений. Репарация ДНР может происходить путем гомологичной (HR) или незаконной (NHEJ) рекомбинации. Облучение вызывает остановку клеточного цикла в G2-фазе, для которой характерна репарация путем гомологичной рекомбинации.

Влияния мутации *rad9* на митотическую гомологичную рекомбинацию, генную конверсию и кроссинговер не обнаружено [13]. Ген *RAD9* не участ-вует в репарации индуцированного разрыва или интеграции плазмиды в ре-зультате гомологичной рекомбинации [29–31]. Таким образом, нет особых оснований предполагать непосредственное участие продукта чекпойнт-гена *RAD9* в репарации ДНР ДНК, использующей гомологичную рекомбинацию. Однако показана зависимость минорного пути репарации NHEJ от генов

*RAD9*, *RAD24*, *RAD17*, *RAD53* [31–33]. Эффекты мутаций *rad9Δ* и *rad24Δ*, снижающих эффективность NHEJ, аддитивны [31]. У гаплоидного двойного мутанта *rad9Δ rad24Δ* эффективность репарирования линейаризованной по сравнению с ковалентно-замкнутой кольцевой плазмидой составляет 6 % от уровня дикого типа, задерживание клеточного цикла в фазах G1 или G2 приводит к повышению этого уровня до 50 %, но не восстанавливает эффективность NHEJ полностью. Таким образом, чекпойнт-гены помимо остановки клеточного цикла имеют дополнительную роль в регуляции эффективности NHEJ. Кроме того, при репарации повреждений, вызванных  $\gamma$ -излучением и радиомиметиком ММС, чекпойнт-контроль, обусловленный генами *RAD9-RAD24*, и ген *YKU80* функционируют на одном и том же пути незаконной рекомбинации (NHEJ) [31]. С этим хорошо согласуется тот факт, что чекпойнт-белки Rad9 и Mec1 необходимы для перемещения белков Yku80, Sir3 и Sir4 с теломерных участков к сайту ДНР ДНК в процессе NHEJ [34–36], где они фиксируют и защищают от нуклеаз концы ДНР ДНК [37].

У мутанта *rad24Δ* искусственная задержка клеточного цикла не компенсировала снижение эффективности репарации одиночных ДНР путем гомологичной рекомбинации [38]. Причем мутация *rad24Δ* не влияла на аллельную рекомбинацию между последовательностями с одинаковой локализацией на гомологичных хромосомах, для которой требуются протяженные гомологичные участки, но влияла на эктопическую рекомбинацию между дисперсными гомологичными последовательностями протяженностью не более 5 тпн. Эпистатический характер взаимодействия мутаций показал, что чекпойнт-гены *RAD24*, *RAD17*, *MEC3*, *MEC1*, *RAD53* и *DUN1* контролируют неразветвленную последовательность функций, определяющую выживаемость гаплоидных клеток при индукции единичного ДНР ДНК, репарация которого осуществляется путем эктопической рекомбинации [38]. Мутации *rad17Δ*, *rad53Δ*, а также *mec3Δ*, *mec1Δ* и *dun1Δ* по одиночке или в комбинации с мутацией *rad24Δ* вызывают один и тот же эффект в отношении выживаемости клеток. Однако мутация *rad24Δ* сильнее модифицирует выживаемость клеток, обусловленную эктопической рекомбинацией, по сравнению с мутацией *rad9Δ*; выживаемость двойных мутантов *rad9Δ rad24Δ* сравнима с выживаемостью одиночных мутантов *rad24Δ* [38]. Два других чекпойнт-мутанта, такие как *chk1Δ* и *pds1Δ*, имеют фенотип, сходный с фенотипом *rad9Δ*. Авторы предполагают, что гены *RAD9*, *CHK1* и *PDS1* функционируют вместе на отдельном пути, обеспечивающем остановку клеточного цикла и вносящем небольшой вклад в выживаемость клеток с поврежденной хромосомой. Вторая *RAD24*-ветвь помимо остановки клеточного цикла принимает участие также в эктопической рекомбинации между короткими гомологичными участками, поэтому наблюдается гипостатический эффект мутации *rad9Δ*.

Участие генов *RAD9* и *PDS1* помимо контроля прохождения клеточного цикла также в контроле различных путей репарации ДНР ДНК, NHEJ и SSA,

соответственно, продемонстрировано в работе [33]. Более того, не только чекпойнт-контроль направляет репарацию повреждений, но и гены репарации могут принимать участие в активации чекпойнт-контроля [39].

В других работах *RAD9* также отнесен к отдельной от *RAD24/RAD17* сенсорной ветви чекпойнт-контроля (см. [39, 40]). В ответ на образование коротких 3'-концов в теломерной области у мутантов *yku70Δ* и *cdc13-1* белки Rad9, Mec1, Chk1, Pds1 работают на одной ветви чекпойнт-контроля, отличной от ветви, контролируемой белками Rad24, Rad17, Rad53, Ddc1, Ddc2, Mec1, Mec3, Dun1 [40]. В первом случае процессирование осуществляется экзонуклеазой Exo1, а во втором случае комплексом MRE11. Для загрузки экзонуклеазы Exo1 в район разрыва ДНК не требуется предварительная загрузка белкового комплекса Rad24-Rfc2-5. В процессе активации *RAD24*-пути формируются концы разрыва ДНК, способные активировать *RAD9*-путь. Протяженные участки онДНК, образованные у мутантов *cdc13-1*, индуцируют остановку в равной степени обусловленную путями *RAD24/RAD53/DUN1* и *RAD9/CHK1/PDS1*. Менее протяженные участки онДНК, образованные у мутантов *yku70Δ*, индуцируют в основном остановку, обусловленную *CHK1/PDS1*-путем (75%), оставшиеся 20 % обусловлены *MAD2*-зависимым путем чекпойнт-контроля веретена, активация которого происходит вследствие вторичного образования дицентриков. Участки онДНК у мутантов *yku70Δ* и *cdc13-1* отличаются не только протяженностью, но, возможно, и упаковкой теломерных участков ДНК.

Мы анализировали радиочувствительность диплоидных штаммов в стационарной фазе роста. У диплоидных штаммов, имеющих двойной набор хромосом, гомологичная рекомбинация возможна на всех стадиях клеточного цикла. HR осуществляется по механизму межхромосомной рекомбинации у диплоидов в стационарной фазе и по механизму межхроматидной рекомбинации у гаплоидов и диплоидов в фазе G2. У диплоидных штаммов минорный путь репарации путем незаконной рекомбинации NHEJ подавлен, поскольку у гетерозигот по типу спаривания репрессирован ген *NEJ1*, участвующий в NHEJ, что направляет репарацию по пути HR, а не NHEJ [41, 42]. Гены *RAD9*, *RAD24*, *RAD17* принимают участие в минорных путях репарации, которые подавлены у диплоидов. По-видимому, их влияние обусловлено в основном регуляцией остановки клеточного цикла.

Гены можно разделить на три группы в отношении радиочувствительности. В наших опытах мутация *rad9Δ* сильнее модифицировала чувствительность клеток к  $\gamma$ -излучению по сравнению с мутациями *rad24Δ* и *rad17Δ*, и, кроме того, мутации *rad24Δ* и *rad17Δ* снижали влияние *rad9Δ* на радиочувствительность. По-видимому, гены *RAD9*, *RAD24* и *RAD17* эпистатичны в регуляции остановки клеточного цикла, которая и определяет уровень радиочувствительности при  $\gamma$ - и УФ-облучении диплоидных штаммов в стационарной фазе.

Радиочувствительность мутантов *rad53* выше радиочувствительности мутантов *rad17Δ* и *rad24Δ*, но ниже радиочувствительности мутантов *rad9Δ* на линейном участке кривой, т.е. в фазе G1 (рис. 3). Можно предположить, что *RAD9* принимает участие в дополнительном *RAD53*-независимом пути определения радиочувствительности, а ген *RAD53* контролирует дополнительные пути помимо *RAD17/RAD24*-зависимого. *RAD9*-ветвь играет более значительную роль в определении радиочувствительности, возможно, за счет *CHK1*-пути. Эти ветви не являются полностью независимыми. Для активации чекпойнт-контроля необходимо активационное фосфорилирование белков Rad9 и Rad53. Фосфорилирование Rad9p в фазе G2 зависит от Mec1p, а в фазе G1 — также от Rad24p, Rad17p-Ddc1p-Mec3p [26]. Индуцированная повреждениями ДНК модификация Rad53p в клетках, заблокированных в фазах G1 и G2, зависит от интактных *RAD9*- и *RAD24*-ветвей чекпойнт-контроля [23]. Сверхпродукция Rad9p в клетках *rad24Δ* или Rad24p в клетках *rad9Δ* восстанавливает G1/S-остановку, G2/M-остановку, транскрипционный ответ и выживаемость клеток.

При УФ-облучении диплоидных культур мы наблюдали компенсаторное действие мутаций *rad17Δ* и *rad24Δ* по отношению к мутации *rad9Δ*. Известно, что при УФ-облучении задержка клеточного цикла приводила к частичному повышению выживаемости мутанта *rad9Δ* [27]. Позднее было показано, что гены *RAD9* и *RAD24* участвуют в индуцибельной эксцизионной репарации (NER) пиримидиновых димеров в транскрибируемой и нетранскрибируемой областях [43]. Однако характер взаимодействия этих генов не определялся. Кроме того, гены *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* необходимы для репликации ДНК с нерепарированными УФ-повреждениями [13]. Анализ показал, что гены *RAD9* и *RAD52* позитивно, а гены *RAD24* и *RAD17* негативно регулируют обмен между сестринскими хроматидами и действие этих мутаций эпистатично. Аналогичную картину мы наблюдали при УФ-облучении стационарных диплоидных культур. Таким образом, не исключено, что в определении радиочувствительности помимо эпистатического взаимодействия в остановке клеточного цикла мутации взаимодействуют эпистатически и в некоторых видах репарации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Resnick M. A., Cox B. S. Yeast as an honorary mammal // Mutation Res. 2000. V. 451. P. 1–11.
2. Yu Z., Chen J., Ford B.N., Bracley M. E., Glickman B. W. Human DNA repair systems: an overview // Environ. Mol. Mutagen. 1999. V. 33. P. 3–20.
3. Foury F. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast // Gene. 1997. V. 195. P. 1–10.
4. DeRisi J. L., Iyer V. R., Brown P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale // Science. 1997. V. 278. P. 680–686.

5. Causton H. C., Ren B., Koh S. S., Harbison C. T., Kanin E., Jenings E. G., Lee T. I., True H. L., Lander E. S., Young R. A. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 323–337.
6. Jelinsky S. A., Estep P., Church G. M., Samson L. D. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 8157–8167.
7. Game J. C. The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century // *Mutation Res.* 2000. V. 451. P. 277–293.
8. Глазев В. М., Глазунов А. В. Молекулярно-генетический анализ репарации двуни-  
тевых разрывов ДНК у дрожжей-сахаромицетов // *Генетика.* 1999. Т. 35. С. 1449–  
1469.
9. Королев В. Г. Молекулярные механизмы репарации двуни-тевых разрывов ДНК у  
эукариот // *Радиобиология.* 2007. В печ.
10. Weinert T. DNA damage checkpoints update: getting molecular // *Curr. Opin. Genet.  
Dev.* 1998. V. 8. P. 185–193.
11. Foiani M., Pellicoli A., Lopes M., Lucca C., Ferrari M., Liberi G., Falconi M. M.,  
Plevani P. DNA damage checkpoints and replication controls in *Saccharomyces cere-  
visiae* // *Mutation Res.* 2000. V. 451. P. 187–196.
12. Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interac-  
tions with repair // *Cell.* 1998. V. 94. P. 555–558.
13. Paulovich A. G., Armour C. D., Hartwell L. H. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9,  
RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating, Ultraviolet-induced DNA  
damage // *Genetics.* 1998. V. 150. P. 75–93.
14. Gardner R., Putnam C. W., Weinert T. RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel  
G<sub>2</sub>/M checkpoint pathways in budding yeast // *The EMBO J.* 1999. V. 18. P. 3173–  
3185.
15. King W. R., Rowley R., Schroeder A. L. Ionizing irradiation effects on S-phase in  
checkpoint mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2003. V. 42.  
P. 313–321.
16. Koltovaya N. A., Arman I. P., Devin A. B. Mutation of the CDC28 gene and the radia-  
tion sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* 1998. V. 14. P. 133–146.
17. Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. Laboratory course manual for methods in yeast  
genetics // Cold Spring Harbor Laboratory. 1986. NY.
18. Devin A. B., Prosvirova T. Yu., Peshekhonov V. T., Chepurnaya O. V., Smirnova M. Ye.,  
Koltovaya N. A., Troitskaya E. N., Arman I. P. The Start gene CDC28 and the genetic  
stability of yeast // *Yeast.* 1990. V. 6. P. 231–243.
19. Lydall D., Weinert T. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implica-  
tions for repair and arrest // *Science.* 1995. V. 270. P. 1488–1491.
20. Paulovich A. G., Margulies R. U., Garvik B. M., Hartwell L. H. RAD9, RAD17, and  
RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response  
to DNA damage // *Genetics.* 1997. V. 145. P. 45–62.



21. Eckhardt-Schupp F., Siede W., Game J. C. The *RAD24* (=R<sub>1</sub><sup>s</sup>) gene product of *Saccharomyces cerevisiae* participates in two different pathways of DNA repair // *Genetics*. 1987. V. 115. P. 83–90.
22. Navas T. A., Sanchez Y., Elledge S. J. *RAD9* and DNA polymerase  $\epsilon$  form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev*. 1996. V. 10. P. 2632–2643.
23. de la Torre Ruiz M. A., Green C. M., Lowndes N. F. *RAD9* and *RAD24* define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation // *EMBO*. 1998. V. 17. P. 2687–2698.
24. Elledge S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis // *Science* 1996. V. 274. P. 1664–1672.
25. Rouse J., Jackson S. P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage // *Science*. 2002. V. 297. P. 547–551.
26. Vialard J. E., Gilbert C. S., Green C. M., Lowndes N. F. 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.
27. Aboussekhra A., Vialard J. E., Morrison D. E., de la Torre-Ruiz M. A., Cernakova L., Fabre F., Lowndes N. F. A novel role for the budding yeast *RAD9* checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription // *EMBO J*. 1996. V. 15. P. 3912–3922.
28. 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.
29. Schiestl R. H., Zhu J., Petes T. D. Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol*. 1994. V. 14. P. 4493–4500.
30. Sugawara N., Ivanov E. L., Fishman-Lobell J., Ray B. L., Wu X., Haber J. E. DNA structure-dependent requirements for yeast *RAD* genes in gene conversion // *Nature*. 1995. V. 373. P. 84–86.
31. de la Torre-Ruiz M. A., Lowndes N. F. *DUNI* defines one branch downstream of *RAD53* for transcription and DNA damage repair in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS Lett*. 2000. V. 485. P. 206–206.
32. Lee S. E., Paques F., Sylvan J., Haber J. E. Role of yeast *SIR* genes and mating type in channeling double-strand breaks to homologous and nonhomologous recombination pathways // *Curr. Biol*. 1999. V. 9. P. 767–770.
33. De Mase D., Zeng L., Cera C., Fasullo M. The *Saccharomyces cerevisiae PDS1* and *RAD9* checkpoint genes control different DNA double-strand break repair pathways // *DNA Repair (Amst.)* 2005. V. 4. P. 59–69.
34. Martin S. G., Laroche T., Suka N., Grunstein M., Gaser S. M. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast // *Cell* 1999. V. 97. P. 621–633.
35. Mills K. D., Sinclair D. A., Guarente L. *MEC1*-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks // *Cell*. 1999. V. 97. P. 609–620.

36. McAinsh A.D., Scott-Drew S., Murray J.A., Jackson S.P. DNA damage triggers disruption of telomeric silencing and Mec1p-dependent relocation of Sir3p // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. P. 963–966.
37. Teo S.H., Jackson S.P. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4788–4795.
38. Aylon Y., Kupiec M. The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 6585–6596.
39. Lowndes N.F., Murguia J.R. Sensing and responding to DNA damage // *Curr. Opin. Genet. Deversion.* 2000. V. 10. P. 17–25.
40. Maringele L., Lydall D. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast *yku70Delta* mutants // *Genes Deversion.* 2002. V. 16. P. 1919–1933.
41. Frank-Vaillant M., Marcand S. Nonhomologous end joining regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway // *Genes Deversion.* 2001. V. 15. P. 3005–3012.
42. Valencia M., Bentele M., Vaze M.B., Herrmann G., Kraus E., Lee S.E., Schar P., Haber J.E. NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature.* 2001. V. 414. P. 666–669.
43. Yu S., Teng Y., Lowndes N.F., Waters R. RAD9, RAD24, RAD16 and RAD26 are required for the inducible nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers from the transcribed and non-transcribed regions of the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene // *Mutation Res.* 2001. V. 485. P. 229–236.

Получено 24 августа 2007 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 16.11.2007.

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

Усл. печ. л. 1,25. Уч.-изд. л. 1,56. Тираж 220 экз. Заказ № 55961.

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

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

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