

УДК 575.1/2:577.2

SOS-РЕПАРАЦИИ 60 ЛЕТ

© 2013 г. Г. Б. Завильгельский*

Государственный научный центр “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

Поступила в редакцию 08.04.2013 г.

Принята к печати 11.04.2013 г.

В историческом аспекте рассмотрены представления о механизме SOS-репарации и SOS-мутагенеза у про- и эукариот. Прослежен путь от эксперимента Дж. Вейгла, выполненного в 1953 г. (индукция мутаций у бактериофага λ при высева на УФ-облученных бактериях), до современных исследований, проводимых на живых организмах всех царств – *Eukarya*, *Archaea* и *Bacteria*. Ключевым достижением стало открытие в 1998–1999 гг. специфических ДНК-полимераз (PolV и др.), способных осуществлять translesion synthesis на поврежденной ДНК-матрице. В обзоре приведены современные данные об особенностях процессов SOS-мутагенеза в клетках *Escherichia coli* и *Homo sapiens*.

Ключевые слова: SOS-репарация, SOS-мутагенез, translesion synthesis, *umuC*, *umuD*, ДНК-полимераза, Y-семейство, RecA, пиримидиновый димер, AP-сайт, пигментная ксеродерма.

SOS-REPAIR – 60 YEARS, by G. B. Zavilgelsky* (State Research Center “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: zavilgel@genetika.ru). This review integrates 60 years of research on SOS-repair and SOS-mutagenesis in prokaryotes and eucaryotes, from Jean Weigle experiment in 1953 year (mutagenesis of lambda bacteriophage in UV-irradiated bacteria) to the latest achievements in studying SOS-mutagenesis on all living organisms – *Eukarya*, *Archaea* and *Bacteria*. A key role in establishing of a biochemical basis for SOS-mutagenesis belongs to the finding in 1998–1999 years that specific error-prone DNA polymerases (PolV and others) catalysed translesion synthesis on damaged DNA. This review focuses on recent studies addressing the new models for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli* and *Homo sapiens* cells.

Keywords: SOS-repair, SOS-mutagenesis, translesion synthesis, *umuC*, *umuD*, DNA polymerase, Y-family, RecA, pyrimidine dimer, AP site, *Xeroderma pigmentosum*.

DOI: 10.7868/S0026898413050224

ИСТОРИЯ

В 1953 г. были опубликованы три статьи, сыгравшие ключевую роль в становлении современной биологии. Прежде всего, это статья Дж. Уотсона и Ф. Крика (Watson J. и Crick F.) о пространственной структуре ДНК, возвестившая о начале эры молекулярной биологии [1]. Эта работа немедленно получила полное признание научной общественности, а ее авторы стали Нобелевскими лауреатами. Второй статье, авторами которой были Дж. Вейгл и Г. Бертани (Weigle J. и Bertani G.), повезло значительно меньше, она была замечена лишь вирусологами и микробиологами [2]. Вейгл и Бертани описали странный, на первый взгляд, феномен: у бактериофага, прошедшего цикл размножения на клетках одного штамма бактерий, на несколько порядков снижалась способность размножаться на другом штамме. Однако

после прохождения следующего цикла размножения на втором штамме восстанавливалась высокая эффективность посева бактериофага на обоих штаммах. Как стало ясно впоследствии, была открыта система рестрикции-модификации ДНК типа I. В дальнейшем были обнаружены системы рестрикции-модификации типа II, III и IV. Наступила эра геной инженерии. В. Арбер (Arber W.), расшифровавший механизм действия ферментов типа I, а также Г. Смит и Д. Натанс (Smith H.O., Nathans D.), открывшие систему рестрикции-модификации типа II, в 1978 г. получили Нобелевскую премию.

Третья статья, автором которой также был Дж. Вейгл (Weigle J.), заинтересовала, как и предыдущая, лишь “узких” специалистов [3]. Вейгл обнаружил, что, если УФ-облученный бактериофаг высеять на предварительно УФ-облученные бактерии, то выживаемость бактериофага увеличит-

*Эл. почта: zavilgel@genetika.ru

ся и одновременно, что очень важно, у фага фиксируется множество мутаций. В дальнейшем стало ясно, что Вейгл открыл феномен SOS-индуцированной репарации и мутагенеза. В настоящее время эти эффекты в честь их автора называют W-реактивация и W- мутагенез. Отметим, что термины “W-реактивация” и “W-мутагенез” относятся лишь к бактериофагам и плазмидам. Применительно же к бактериям и клеткам эукариот используют термины “SOS-репарация” и “SOS-мутагенез”, впервые введенные в употребление М. Радманом (Radman M.) в 1970 г. [4–7].

Долгое время молекулярные механизмы процессов SOS-репарации и SOS-мутагенеза оставались нерасшифрованными. Уже были открыты и детально проанализированы процессы эксцизионной репарации (1964 г., Setlow R., Howard-Flanders P.) [8, 9] и пострепликативной репарации у бактерий (1968 г., Rupp W., Howard-Flanders P.) [10], но механизмы SOS-репарации и SOS-мутагенеза оставались неразгаданными. В конце 60-х–начале 70-х гг. выяснилось, что белки RecA и LexA играют ключевую роль в регуляции SOS-ответа бактериальной клетки на действие генотоксических агентов, повреждающих ДНК [11, 12]. В результате удалось идентифицировать группу (более 40) генов (SOS-регулон), экспрессия которых индуцируется при SOS-ответе и регулируется белками RecA и LexA. В 1977 г. в составе SOS-регулона обнаружили два гена (*umuC* и *umuD*), продукты которых необходимы для осуществления SOS-мутагенеза [13].

Прошло еще 20 лет. В 1998–99 гг. двум группам ученых из США и Израиля удалось доказать, что процесс SOS-репарации (он же “translesion synthesis”, TLS) осуществляется ДНК-полимеразой V ($UmuD'_2C$, или PolV) [14–18]. А еще через 10 лет, в 2009 г., установили, что PolV делает это в комплексе с активированным белком RecA* [19, 20].

Подробно история основных достижений и открытий в области “SOS-репарации” представлена в обзорах [6, 7].

“RecA–LexA”-РЕГУЛЯЦИЯ В *Escherichia coli*

Ключевые элементы SOS-системы — белки RecA и LexA. LexA репрессирует группу генов (около 40), входящих в состав SOS-регулона [21, 22]. RecA — мультифункциональный белок. Во-первых, он обладает высоким сродством к оцДНК, в результате чего образуется растянутый филамент RecA : ДНК (один мономер RecA на каждые 4 н. ДНК). Во-вторых, RecA в этом комплексе активируется (активированный RecA обозначают как RecA*) и приобретает свойства специфической протеазы, которая деградирует белок-репрессор LexA (точнее, ускоряет авторасщепление LexA). В результате деградации мо-

лекулы LexA открываются гены SOS-регулона, в том числе два гена *umuD* и *umuC*, которые имеют прямое отношение к индуцированному мутагенезу [13]. Отметим специфическую активность RecA* по отношению к белку UmuD. При взаимодействии RecA* с UmuD от N-конца UmuD отщепляются первые 24 аминокислотных остатка, что приводит к образованию белка UmuD', который принимает непосредственное участие в SOS-мутагенезе [23]. Кроме того, RecA — ключевой белок, необходимый для гомологичной рекомбинации, он способствует переносу цепи ДНК с одной молекулы на другую и участвует в процессе пострепликативной репарации.

TLS В *Escherichia coli*

Преодоление блока репликации, вызванного летальным дефектом в ДНК, называют “translesion synthesis” (TLS). В SOS-индуцированных клетках *E. coli* в области повреждения ДНК формируется особая структура: дцДНК вплоть до дефектного нуклеотида; ДНК-полимераза, связанная с 3'-ОН-концом последнего нуклеотида, встроенного в цепь ДНК (в клетках *E. coli* — PolIII); дефектный нуклеотид в матричной цепи и оцДНК в виде филамента (RecA* : ДНК). Ключевую роль в заполнении “бреши” в ДНК играют два белка — UmuD' и UmuC, которые образуют комплекс $(UmuD')_2UmuC$. Основная задача этого комплекса — заполнить “брешь” напротив дефекта. Подобный вариант синтеза и носит наименование TLS. Как правило, TLS сопровождается включением во вновь синтезируемую цепь нуклеотида, некомплементарного исходному основанию в матрице. В результате возрастает выживаемость клетки (SOS-репарация) и возникает мутация (SOS-мутагенез). Идентичность TLS и SOS-репарации впервые была показана на ДНК бактериофага λ в *E. coli* [24].

Ученым из США и Израиля удалось полностью реконструировать мутагенную SOS-систему *in vitro*. Основной трудностью этой работы было выделение в чистом виде водонерастворимого белка UmuC. Ученые одной группы во главе с Вудгейтом и Гудменом (Woodgate R. и Goodman M.F.) добились успеха, используя для выделения не искомый белок UmuC, а водорастворимый комплекс $(UmuD')_2UmuC$, активный в SOS-мутагенезе [14, 15]. Вторая группа во главе с Ливни (Livneh Z.) сумела выделить UmuC, предварительно связав его с белком-помощником MBP (белок, связывающий мальтозу). В результате этой манипуляции сложный комплекс стал водорастворимым, не потеряв при этом мутагенной активности [16]. В этих работах показано, что две стадии SOS-мутагенеза четко разделены во времени и по зависимости от ключевых SOS-белков. Первая стадия включение нуклеотида напротив дефектного ос-

нования. На этой стадии выполняется так называемое “А-правило”, например, напротив AP-сайта чаще ставится аденин, и реже включаются другие нуклеотиды. Вторая стадия - элонгация, или последующий синтез ДНК на матрице. В изолированных и очищенных препаратах комплекса $(UmuD')_2UmuC$ всегда присутствовала небольшая полимеразная активность, поэтому предполагали, что это связано с примесью PolII или III (PolII была отвергнута в ранних экспериментах). Однако в дальнейшем были получены доказательства того, что комплекс $(UmuD')_2UmuC$ – это самостоятельная ДНК-полимераза типа “*ergo-prone*”, получившая номер V (PolV) [17]. Комплекс $(UmuD')_2UmuC$ выделили из клеток бактерий, несущих делецию гена *polB* (PolII) и *ts*-мутацию в гене *dnaE* (*dnaE1026*), ответственном за синтез PolIII. Используя оцДНК фага M13 в качестве матрицы с AP-сайтом (обозначен как X) и меченный ^{32}P праймер (30 н.)

(dCTP dATP

праймер 5'-P 32 – T-G-G-3'-ОН

матрица 3'-ОН – A-C-C-G-X-A-C-T-A-A-T-T-C-T-G-5'-P),

показали, что очищенный комплекс $(UmuD')_2UmuC$ в присутствии RecA, ATP и четырех dNTP самостоятельно ведет синтез ДНК, причем напротив G (перед дефектом) ставит C (используя для включения dCTP, – комплементарный синтез), а напротив X – случайный нуклеотид (используя dATP, – TLS). Эффективность TLS принципиально зависит от белка RecA и значительно усиливается при добавлении в смесь белка SSB и вспомогательных субъединиц PolIII (β и γ), в норме обеспечивающих процессинг синтеза новой цепи (β -sliding clamp – скользящий зажим, γ -clamp-loading complex – комплекс, заряжающий зажим). Следующие нуклеотиды (комплементарные матричным – A, C, T и т.д.) также включаются, однако этот процесс резко усиливается при добавлении в реакционную смесь PolIII. При добавлении PolIII в реакционную смесь до прохождения AP-сайта TLS ингибируется, что объясняется конкуренцией PolIII и PolIV за 3'-ОН-группу конечного нуклеотида в праймере. В комплексе $(UmuD')_2UmuC$ собственно полимеразной активностью обладает UmuC, а субъединица UmuD' служит активатором [18]. Показано [16], что механизм SOS-мутации позволяет клетке заменить мутацию со сдвигом рамки (инсерция или делеция нуклеотида), как правило, инактивирующую, на более “мягкую” по последствиям мутацию замещения (транзицию или трансверсию).

В 2009 г. было показано, что активной формой PolIV является не $UmuD'_2C$, а комплекс $UmuD'_2C$ - RecA*-ATP [19]. На рис. 1 схематично представлены процессы активации PolIV, TLS и дезактива-

ции PolIV. В отсутствие RecA* полимеразы $UmuD'_2C$ имеет низкую активность. Активированная форма RecA* в комплексе с ATP, образованная на оцДНК, переносится на PolIV. В результате формируется “мутасома” PolIV-Mut ($UmuD'_2C$ -RecA*-ATP), которая осуществляет TLS на поврежденной матрице. Затем фермент инактивируется и диссоциирует, но комплекс RecA-ATP остается связанным с белком, однако он переходит с UmuD' на UmuC. Далее PolIV вновь активируется, но для этого она должна связать новый RecA*-ATP и освободиться от комплекса RecA-ATP с UmuC.

При введении в SOS-индуцированные клетки неповрежденной матрицы наблюдается так называемый “non-targeted”-мутагенез. В ранних работах в качестве подобной матрицы использовали необлученную ДНК бактериофага λ . Показано, что белок DinB (ген *dinB* относится к группе SOS-генов) ответствен за “non-targeted” мутагенез, а его сверхпродукция приводит к появлению мутаторного фенотипа и летальному эффекту [25–31]. Белок DinB проявляет полимеразную активность с низкой точностью копирования и, как и PolIV, слабую процессивность, поэтому его назвали PolIV. PolIV не обладает редактирующей экзонуклеазной активностью, он гомологичен белкам семейства UmuC [26]. Ген *dinB* контролируется двумя регуляторными системами, SOS (RecA-LexA) и RpoS (субъединица РНК-полимеразы, синтезируемая при переходе клеток в стационарную фазу) [32, 33]. PolIV участвует в формировании адаптивных мутаций: в мутанте $\Delta dinB$ уровень адаптивных мутаций примерно в 5 раз ниже [34]. PolIV может использовать в качестве субстрата 8-оксодезоксигуанозинтрифосфат (8-охо-dGTP), который при включении в ДНК формирует пару как с дезоксицитидином, так и с дезоксиаденозином. При спаривании 8-охо-dG с dA в ДНК возникает трансверсия GC-TA. Показано, что летальный эффект при сверхпродукции PolIV определяется включением в синтезируемую цепь ДНК 8-охо-dG, который образуется в результате окисления активными формами кислорода [35]. Увеличение содержания PolIV в бактериальной клетке в условиях стресса указывает на важную роль этого фермента в поддержании жизнеспособности популяции за счет усиления процесса спонтанного мутагенеза в неблагоприятных условиях (голодание, повреждение хромосомы и др.).

Таким образом, в клетках *E. coli* насчитывается пять ДНК-полимераз: PolI (репарирующую) обнаружил А. Корнберг (Kornberg A.) в 1956–1958 гг., PolII и PolIII (III реплицирующая) выявили в 1970–1971 гг., PolIV и V идентифицировали в 1999 г.

Помимо определения основных принципов действия SOS-мутагенной системы *in vitro*, получили ряд новых принципиальных результатов по регу-

ляции SOS-системы *in vivo*. Так, например, оказалось, что белки UmuD и UmuC подвергаются деградации под действием сериновой АТР-зависимой протеазы Lon. Процессированный белок UmuD', с N-конца которого удалены 24 аминокислотных остатка, в том числе фрагмент 15-FPLF, служащий мишенью для Lon-протеазы, расщепляется (в комплексе с UvrD) под воздействием другой АТР-зависимой протеазы ClpXP [36, 37]. В результате после SOS-индукции в бактериальной клетке довольно быстро восстанавливается нормальный уровень мутагенных белков, характерный для неиндуцированных клеток.

Гены, кодирующие TLS (“error-prone”) полимеразы, расположены не только в хромосомах бактерий, но и в мобильных элементах, в частности, в конъюгативных R-плазмидах [38, 39]. В плазмиде rKM101, делеционном варианте R46, расположены гены *musAB*, структурно и функционально гомологичные генам *umuDC* [40]. Оперон *musAB*, как и *umuDC*, репрессируется белком LexA и индуцируется при повреждении бактериальной ДНК [41]. RecA*-зависимый протеолиз белка MusA (с отщеплением 24 N-концевых аминокислотных остатков) происходит значительно быстрее, что определяет повышенную эффективность MusA₂'B, по сравнению с UmuD₂'C, в процессе TLS [42]. Необходимо отметить, что гены *musAB* использовали в качестве мутаторов в тесте Эймса, что позволило впервые показать мутагенную активность канцерогенов — циклических углеводородов и ряда других соединений [43].

Белок UmuD не только непосредственно участвует в процессе TLS (в составе PolV), но и регулирует этот процесс [44–46]. Синтезированный в процессе SOS-индукции белок UmuD образует гомодимер UmuD₂, который ингибирует TLS. В результате клетка получает дополнительное время для проведения безошибочной (“error-free”) репарации (в частности, эксцизионной). При взаимодействии UmuD₂ с α -субъединицей PolIII ослабевает контакт α -субъединицы со скользящим зажимом (β -clamp), что приводит к отделению PolIII от ДНК и способствует формированию связи подвижного зажима с PolV. Примерно через 50 мин после начала SOS-индукции в клетке в результате медленного RecA*-стимулированного автопротеолиза формируется димер UmuD₂'. Этот димер в комплексе с UmuC начинает осуществлять TLS с включением в ДНК некомментарных нуклеотидов, что также повышает вероятность выживания клетки. Образование гетеродимера UmuDD' ингибируется в результате взаимодействия с белком DinB (PolIV).

TLS В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

1999 г. стал “урожайным” на новые формы TLS-полимераз не только у прокариот, но и у различных эукариотических организмов. В клетках человека обнаружили Pol η , участвующую в репарации ДНК. Как известно, мутантные клетки больных пигментной ксеродермой (*Xeroderma pigmentosum*, XP) в 1000 раз чувствительнее к солнечному свету, чем нормальные клетки. У больных XP с высокой частотой развиваются меланомы и немеланомные формы рака кожи. Как правило, мутации у больных XP локализуются в генах системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER⁻). Всего насчитывается семь групп комплементации XP-A, XP-B.....XP-G с дефектами системы NER [47, 48]. Однако примерно 25% больных XP имеют нормальную систему эксцизионной репарации, но их клетки также чувствительны к УФ-излучению. Долгое время поиск гена, ответственного за этот вариант заболевания, названный XP-V (восьмая группа комплементации), был безуспешным. В 1999 г. этот ген (*hRAD30*) нашли одновременно две группы исследователей [49–51]. Masutani С. и соавт. [50, 51] использовали в качестве матрицы для репликации плазмиду, содержащую *ori* SV40 и пиримидиновый димер (T=T). Пиримидиновый димер блокировал репликацию, для проведения которой использовали экстракт из клеток XP-V. Добавление в эту смесь фактора из клеток HeLa привело к снятию блока репликации. Фактор очистили и показали, что ген *hRAD30* определяет синтез новой ДНК-полимеразы, получившей индекс η (Pol η человека). Pol η преодолевает барьер из циклобутановых пиримидиновых димеров без формирования мутации, т.е. ставит напротив пиримидинового димера T=T два адениловых остатка, комплементарных тиминам (вариант “error-free bypass”). Геном *Saccharomyces cerevisiae* содержит ген *RAD30*, гомологичный *hRAD30*. Ген *RAD30* кодирует ДНК-полимеразу (также названную Pol η), которая действует, как и Pol η из клеток человека, т.е. ведет безошибочный синтез ДНК (“error-free” Pol η). Подобная ДНК-полимераза найдена и в клетках мыши [52, 53]. Вскоре в клетках человека были обнаружены и подробно охарактеризованы две новые ДНК-полимеразы, ортологи Rad30 (Pol η) дрожжей и DinB (PolIV) бактерий, названные Polt [54–57] и Polk [58–64] соответственно. На неповрежденной матрице Polk ошибается, формируя трансверсии T-G с вероятностью около 10⁻². Polt включает G напротив T с высокой вероятностью (выше 10⁻²), в частности, напротив AP-сайтов, а напротив пиримидинового димера T=T включает G-A.

Подробные характеристики TLS-полимераз из клеток млекопитающих приведены в обзорах [65, 66].

В геноме клеток *S. cerevisiae* идентифицирован ген *REV3* (подобный ген обнаружен в клетках мыши и человека и назван *hREV3*), ответственный за синтез ДНК-полимеразы, также способной вести TLS на поврежденной матрице, однако с включением напротив дефекта ошибочных нуклеотидов (“error-prone” Pol ξ) [67–69]. Pol ξ состоит из двух субъединиц REV3/REV7 [70]. *In vivo* активность Pol ξ стимулируется полимеразой Rev1 (ген *REV1*), которая синтезирует polyC на матрице polyG, а также встраивает C напротив AP-сайтов (dCMP-трансферазная активность) [71]. В клетках больных XP-V отсутствует Pol η , но содержится Pol ξ , в результате чего при УФ-облучении резко усиливается мутагенез и существенно возрастает вероятность возникновения онкологических заболеваний. По гомологии аминокислотных последовательностей Pol ξ относится к В-семейству, в то время как TLS-полимеразы (эукариотические – Pol η , Pol ι , Pol κ , и бактериальные – PolIV, PolV) входят в состав Y-семейства и обнаруживаются в живых организмах всех трех царств *Eukarya*, *Archaea* и *Bacteria* [72–74]. Принципиальное отличие TLS-полимераз *Eukarya* и *Archaea* от бактериальной PolV состоит в их независимости от RecA при преодолении блока репликации или ему подобных белков.

Однако эукариотические TLS-полимеразы, как правило, действуют эффективно лишь вместе с белками-помощниками. В частности, роль помощника выполняет белок REV1, который обладает самостоятельной dCMP-трансферазной активностью [71]. В регуляции TLS участвует также убиквитин. Все охарактеризованные в настоящее время эукариотические полимеразы семейства Y содержат убиквитин-связывающие мотивы UBM или UBZ [75, 76].

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ SOS-МУТАГЕНЕЗА

Все полимеразы, принадлежащие к семейству Y, характеризуются повышенной мутагенной активностью (“error prone”) и низкой процессивностью [72–74].

Структуру реплицирующих полимераз принято рассматривать как “правую руку”, в которой выделяют домены – “ладонь” (palm), “большой палец” (thumb) и “палец” (finger). Топология структуры Y-полимераз в общих чертах такая же. Однако активный сайт у них более вместим, что позволяет включать в него крупные аддукты, блокирующие репликацию. Кроме того, мотивы “палец” и “большой палец” укорочены, поэтому ослабевает контакт фермента с ДНК и встраиваемым нуклеотидом, что снижает уровень процессинга и ухудшает точность копирования. Полимеразы семейства Y также имеют дополнительный домен – “мизинец” (little finger), который помогает белку прочнее контакти-

ровать с ДНК рядом с поврежденным нуклеотидом [77].

На рис. 2 схематично представлен процесс TLS в клетках *E. coli* и *H. sapiens*. Репликативная ДНК-полимераза (PolIII у *E. coli*; Pol ϵ у *H. sapiens*) в комплексе со скользящим зажимом (β -clamp – *E. coli*; ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) у *H. sapiens*) замещается в области дефекта (обозначен как X) в матричной цепи ДНК TLS-полимеразой в результате взаимодействия со скользящим зажимом [78]. PCNA посттрансляционно модифицируется лигандами Rad18 и Rad6 с образованием моноубиквитинированной формы [79]. Поскольку все эукариотические TLS-полимеразы содержат убиквитин-связывающие мотивы (UBM или UBZ), контакт TLS-полимераз с PCNA в сайте с дефектом X становится более прочным [79, 80]. На следующей стадии TLS-полимеразы (PolV – *E. coli*; Pol η , Pol ι , Pol κ – *H. sapiens*) преодолевают блок репликации, ставя напротив дефектного основания ошибочный (“error-prone”) или комплементарный (“error-free”) нуклеотид (первая стадия), и продолжают (вторая стадия) комплементарный синтез (в клетках *H. sapiens* вторую стадию проводит Pol ξ). Однако в связи с низкой процессивностью эти полимеразы быстро замещаются вновь репликативной полимеразой (PolIII – *E. coli*; Pol ϵ – *H. sapiens*) [81]. У всех позвоночных TLS осуществляет комплекс, так называемая “транслезионосома” (translesionsome) [82]. В состав транслезионосомы входят: одна из полимераз Y-семейства (Pol η , Pol ι , Pol κ); полимеразы В-семейства Pol ξ , которая, в свою очередь, состоит из двух субъединиц – каталитической Rev3 и вспомогательной Rev7; и, наконец, белок Rev1, скрепляющий все компоненты в единой сложной четвертичной структуре через взаимодействие своего C-концевого домена со специфическими областями полимераз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная нагрузка в клетках при TLS лежит на полимеразах типа “error-prone”, во-первых, из-за сложности и разнообразия видов повреждений в ДНК, например, AP-сайтов, не допускающих в принципе действия полимераз “error-free”, а, во-вторых, из-за важности SOS-мутагенеза в судьбе популяции. Резко возрастающие (в 100–1000 раз) темпы мутирования в клетках, подвергнутых обработке ДНК-тропными агентами, дают популяции дополнительный шанс выжить в неблагоприятных стрессовых условиях (подробнее см. [83–85]). Однако для отдельной особи в действии неточных Y-полимераз имеется и много отрицательного. Так, у человека эти полимеразы, индуцируя мутации, участвуют в канцерогенезе (как показано для Pol η и Pol ξ у мутантов XP-V). Поэтому ингибирование ак-

тивности TLS-полимераз в опухолевых клетках может, во-первых, значительно увеличивать чувствительность клеток при химиотерапии ДНК-тропными агентами, а, во-вторых, снижать вероятность возникновения вторичных мутаций, индуцируемых химиотерапевтическими агентами. Подобные работы уже проводятся и дают положительные результаты [86–89].

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (соглашение № 14 U01.21.0845).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. **171**, 964–967.
- Bertani G., Weigle J.J. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**, 113–121.
- Weigle J.J. 1953. Induction of mutation in bacterial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **39**, 628–636.
- Radman M. 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: *Molecular mechanisms for repair of DNA, part A*. Eds Hanawalt P., Setlow R.B. N.Y.: Plenum Publ. Corp., 355–367.
- Bridges B.A. 2005. Error prone DNA repair and translesion DNA synthesis. II. The inducible SOS hypothesis. *DNA repair*. **4**, 725–739.
- Schlacher K., Goodman M. 2007. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 587–594.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A. 2005. *DNA repair and mutagenesis*. 2nd ed., Washington (D.C.): ASM Press, 463–555.
- Setlow R.B., Carrier W.L. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **51**, 226–231.
- Boyce R.P., Howard-Flanders P. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **51**, 293–300.
- Rupp W.D., Howard-Flanders P. 1968. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* **31**, 291–297.
- Defais M., Caillet-Fauquet P., Radman M. 1971. Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetic systems. *Virology*. **43**, 495–503.
- Witkin E.M. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* **40**, 869–907.
- Kato T., Shinoura Y. 1977. Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. *Mol. Gen. Genet.* **156**, 121–131.
- Vandewiele D., Borden A., O’Grady P.I., Woodgate R., Lawrence C. 1998. Efficient translesion replication in the absence of *Escherichia coli* Umu proteins and 3’-5’ exonuclease proofreading function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 15519–15524.
- Tang M., Bruck L., Eritja R., Turner J., Frank E.G., Woodgate R., O’Donnell M., Goodman M.F. 1998. Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD₂C mutagenic complex and RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 9755–9760.
- Reuven B.N., Tomer G., Livneh Z. 1998. The mutagenesis proteins UmuD’ and UmuC prevent lethal frameshifts while increasing base substitution mutations. *Mol. Cell*. **2**, 191–199.
- Tang M., Shen X., Frank E.G., O’Donnell M., Woodgate R., Goodman M.F. 1999. UmuD₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* polV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 8919–8924.
- Reuven N.B., Arad G., Maor-Shoshani A., Livneh Z. 1999. The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD’, RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J. Biol. Chem.* **274**, 31763–31766.
- Jiang Q., Karata K., Woodgate R., Cox M.M., Goodman M.F. 2009. The active form of DNA polymerase V is UmuD₂C-RecA*-ATP. *Nature*. **460**, 359–363.
- Patel M., Jiang Q., Woodgate R., Cox M.M., Goodman M.F. 2010. A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 171–184.
- Little J.W., Mount D.W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*. **29**, 1122.
- Walker G.C. 1984. Mutagenesis and inducible responses in deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**, 60–93.
- Nohmi T., Battista J.R., Dodson L.A., Walker G.C. 1988. RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranslational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 1816–1820.
- Defais M., Lesca C., Monsarrat B., Hanawalt P. 1989. Translesion synthesis is the main component of SOS repair in bacteriophage lambda DNA. *J. Bacteriol.* **171**, 4938–4944.
- Kim S.R., Maenhaut-Michel G., Yamada M., Jamamoto Y., Matsui K., Sofuni T., Nohmi T., Ohmori H. 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* result in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 13792–13797.
- Wagner J., Gruz P., Kim S.R., Yamada M., Matsui K., Fuchs R.P.P., Nohmi T. 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase PolIV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell*. **4**, 281–286.
- Wagner J., Nohmi T. 2000. *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity. *J. Bacteriol.* **182**, 4587–4595.
- Tang M., Pham P., Shen X., Taylor J.-S., O’Donnell M., Woodgate R., Goodman M.F. 2000. Role of *E. coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*. **404**, 1014–1018.
- Kim S.R., Matsui K., Yamada M., Gruz P., Nohmi T. 2001. Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes

- encoding DNA PolIV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics*. **266**, 207–215.
30. Maor-Shoshani A., Hayashi K., Ohmori H., Livneh Z. 2003. Analysis of translesion replication across an abasic site by DNA polymerase IV of *Escherichia coli*. *DNA Repair*. **2**, 1227–1238.
 31. Kuban W., Jonczyk P., Gawel D., Malanowska K., Schaaper R.M., Fijalkowska I.J. 2004. Role of *Escherichia coli* DNA polymerase IV in *in vivo* replication fidelity. *J. Bacteriol.* **186**, 4802–4807.
 32. Layton J.C., Foster P.L. 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **50**, 549–561.
 33. Layton J.C., Foster P.L. 2005. Error-prone DNA polymerase IV is regulated by the heat shock chaperone GroE in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 449–457.
 34. McKenzie G.J., Lee P.L., Lombardo M.J., Hastings P.J., Rosenberg S.M. 2001. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol. Cell*. **7**, 571–579.
 35. Foti J.J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. 2012. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*. **336**, 315–319.
 36. Frank E.G., Gonzalez M., Ennis D., Levine A., Woodgate R. 1996. Regulation of SOS mutagenesis by proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 10291–10296.
 37. Gonzalez M., Frank E.G., Levine A., Woodgate R. 1998. Lon-mediated proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD mutagenesis protein: *in vitro* degradation and identification of residues required for proteolysis. *Genes Dev*. **12**, 3889–3899.
 38. Perry K.L., Elledge S.L., Mitchell B., Marsh L., Walker G.C. 1985. *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA proteins share homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 4331–4335.
 39. Kulaeva O.L., Wooton J.C., Levine A.S., Woodgate R. 1995. Characterization of the *umu*-complementing operon from R391. *J. Bacteriol.* **177**, 2737–2743.
 40. Dobson P.P., Walker G.C. 1980. Plasmid (pKM101)-mediated W-reactivation in *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium* LT: genetic dependence, kinetics of induction, and effect of chloramphenicol. *Mutation Res.* **71**, 25–41.
 41. Elledge S.J., Walker G.C. 1983. The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage. *J. Bacteriol.* **155**, 1306–1315.
 42. Hauser J., Levine A.S., Ennis D.G., Chumakov K.M., Woodgate R. 1992. The enhanced mutagenic potential of the MucAB proteins correlates with the highly efficient processing of the MucA protein. *J. Bacteriol.* **174**, 6844–6851.
 43. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **70**, 782–786.
 44. Ollivierre J.N., Sikora J.L., Beuning P.J. 2011. The dimeric SOS mutagenesis protein UmuD is active as monomer. *J. Biol. Chem.* **286**, 3607–3617.
 45. Silva M.C., Nevin P., Ronayne E.A., Beuning P.J. 2012. Selective disruption of the DNA polymerase III α - β complex by the *umuD* gene products. *Nucl. Acids Res.* **40**, 5511–5522.
 46. Ollivierre J.N., Sikora J.L., Beuning P.J. 2013. Dimer exchange and cleavage specificity of the DNA damage response protein UmuD. *Biochim. Biophys. Acta*. **1834**, 611–620.
 47. Cleaver J.E. 2004. Excision repair – the first steps into mammalian cells. 1968. *DNA Repair*. **3**, 91–99.
 48. Cleaver J.E. 2001. *Xeroderma pigmentosum*: the first of the cellular caretakers. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 398–401.
 49. Johnson R.E., Kondratick C.M., Prakash S., Prakash L. 1999. hRAD30 mutations in the variant form of *Xeroderma pigmentosum*. *Science*. **289**, 263–265.
 50. Masutani C., Kusumoto R., Yamada A., Dohmae N., Yokoi M., Yuasa M., Araki M., Iwai S., Takio J.K., Hanaoka F. 1999. The XP-V (*Xeroderma pigmentosum* variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*. **399**, 700–704.
 51. Masutani C., Araki M., Yamada A., Kusumoto B., Nogimori T., Maekawa T., Iwai S., Hanaoka F. 1999. *Xeroderma pigmentosum* variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.* **18**, 3491–3501.
 52. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. 1999. Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *J. Biol. Chem.* **274**, 15975–15980.
 53. Johnson R.E., Prakash S., Prakash L. 1999. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science*. **283**, 1001–1004.
 54. Tissier A., McDonald J.P., Frank E.G., Woodgate R. 2000. Pol ι , a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev*. **14**, 1642–1650.
 55. Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L., Prakash S., Prakash L. 2000. Eukaryotic polymerase ι and ξ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*. **406**, 1015–1019.
 56. Tissier A., Frank E.G., McDonald J.P., Hanaoka F., Woodgate R. 2000. Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase ι . *EMBO J.* **19**, 5259–5266.
 57. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Wang Z. 2000. Preferential incorporation of G opposite template T by the low fidelity human DNA polymerase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7099–7108.
 58. Ogi T., Kato T.Jr., Kato T., Ohmori H. 1999. Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein DinB. *Genes Cells*. **4**, 607–618.
 59. Gerlach V.L., Aravind L., Gotway G., Schultz R.A., Koonin E.V., Friedberg E.C. 1999. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 11922–11927.
 60. Ohashi E., Bebenek K., Matsuda T., Feaver W.J., Gerlach V.L., Friedberg E.C., Ohmori H., Kunkel T.A. 2000. Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase κ , the product of the human *DINB1* gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 39678–39684.

61. Ohashi E., Ogi T., Kusumoto R., Iwai S., Masutani C., Hanaoka F., Ohmori H. 2000. Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase κ . *Genes Dev.* **14**, 1589–1594.
62. Zhang Y., Yuan F., Xin H., Wu X., Rajpal D.K., Yang D., Wang Z. 2000. Human DNA polymerase κ synthesizes DNA with extraordinary low fidelity. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4147–4156.
63. Zhang Y., Yuan F., WU X., Wang M., Rechkoblit O., Taylor J.S., Geacintov N.E., Wang Z. 2000. Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase κ *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4138–4146.
64. Katafuchi A., Sassa A., Niimi N., Gruz P., Fujimoto H., Masutani C., Hanaoka F., Ohta T., Nohmi T. 2010. Critical amino acids in human DNA polymerases η and κ involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides. *Nucl. Acids Res.* **38**, 859–867.
65. Крутяков В.М., Краветская Т.П. 2010. ДНК-полимеразы и канцерогенез. *Биохимия.* **75**, 959–964.
66. Генинг Л.В. 2011. ДНК-полимераза ι млекопитающих среди участников синтеза ДНК через повреждение. *Биохимия.* **76**, 76–85.
67. Lawrence C.W., Hinkle D.S. 1996. DNA polymerase ξ and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. *Cancer Surv.* **28**, 21–31.
68. Gibbs P.E., McGregor W.G., Maher V.M., Nisson P., Lawrence C.W. 1998. A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunits of DNA polymerase ξ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6876–6880.
69. Lin W., Wu X., Wang Z. 1999. A full length cDNA of hREV3 is predicted to encode DNA polymerase ξ for damage-induced mutagenesis in humans. *Mutat. Res.* **433**, 89–98.
70. Nelson J.R., Lawrence C.W., Hinkle D.C. 1996. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature.* **382**, 729–731.
71. Naracska L., Prakash S., Prakash L. 2002. Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **277**, 15546–15559.
72. Ohmori H., Friedberg E.C., Fuchs R.P., Goodman M.F., Hanaoka F., Hinkle D., Kunkel T.A., Lawrence C.W., Livneh Z., Nohmi T., Prakash L., Prakash S., Todo T., Walker G.C., Wang Z., Woodgate R. 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell.* **8**, 7–8.
73. Hubscher U., Maga G., Spadan S. 2002. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 133–163.
74. Sale J.E., Lehmann A.R., Woodgate R. 2012. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 141–152.
75. Bienko M., Green C.M., Crosetto N., Rudolf F., Zart G., Coult B., Kannouche P., Wider G., Peter M., Lehmann A.R., Hofmann K., Dikic I. 2005. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science.* **310**, 1821–1824.
76. Chun A.C., Jin D.Y. 2010. Ubiquitin-dependent regulation of translesion polymerase. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 110–115.
77. Boudsocq F., Kokoska R.J., Plosky B.S., Vaisman A., Ling H., Kunkel T.A., Yang W., Woodgate R. 2004. Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *J. Biol. Chem.* **279**, 32932–32940.
78. Becherel O.J., Fuchs R.P., Wagner J. 2002. Pivotal role of the β -clamp in translesion DNA synthesis and mutagenesis in *E. coli* cells. *DNA Repair.* **1**, 703–708.
79. Hoegge C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowofakis G., Jentsch S. 2002. RAD6 dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* **419**, 135–141.
80. Maga G., Hubscher U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051–3060.
81. Livneh Z., Shachar S. 2010. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell Cycle.* **9**, 729–735.
82. Wojtaszek J., Lee C.J., D'Souza S., Minesinger B., Kim H., D'Andrea A.D., Walker G.C., Zhou P. 2012. Structural basis of Rev1-mediated assembly of a quaternary vertebrate translesion polymerase complex consisting of Rev1, heterodimeric polymerase Pol ξ , and Pol κ . *J. Biol. Chem.* **287**, 33836–33846.
83. Goodman M.F. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 17–50.
84. Yeiser B., Pepper E.D., Goodman M.F., Finkel S.E. 2002. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 8737–8741.
85. Вельков В.В. 2002. Новые представления о молекулярных механизмах эволюции: стресс повышает генетическое разнообразие. *Молекуляр. биология.* **36**, 277–285.
86. Doles J., Oliver T.G., Cameron E.R., Hsu G., Jacks T., Walker G.C., Hemann M.T. 2010. Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol ξ , sensitizes drug-resistance lung tumors to chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 20786–20791.
87. Xie K., Doles J., Hemann M., Walker G.C. 2010. Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 20792–20797.
88. Sharma S., Shah N.A., Joiner A.M., Roberts K.H., Canman C.E. 2012. DNA polymerase ξ is a major determinant of resistance to platinum-based chemotherapeutic agents. *Mol. Pharmacol.* **81**, 778–787.
89. Makridakis N.M., Reichardt J.K. 2012. Translesion DNA polymerases and cancer. *Front Genet.* **3**, 174–186.

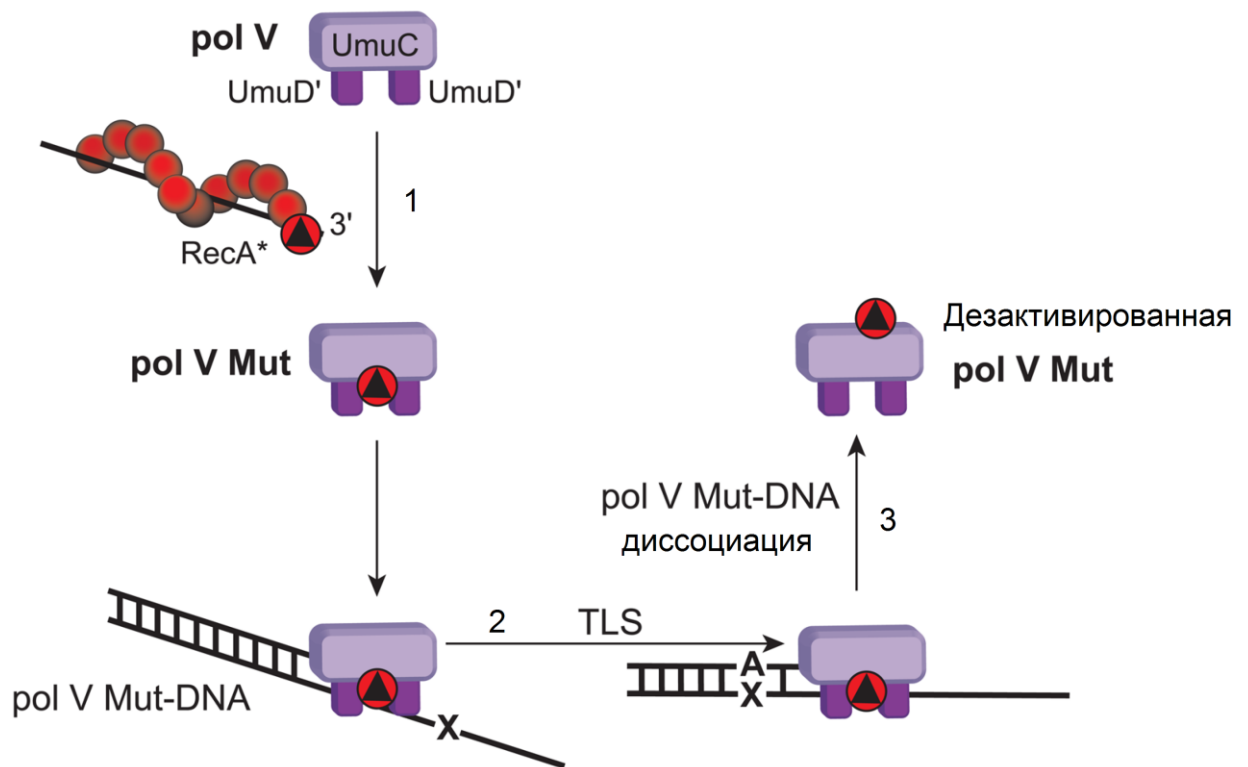


Рис. 1. Активация и дезактивация ДНК-полимеразы PolV. 1 – Активация PolV в результате образования комплекса RecA*-АТФ с субъединицами UmuD'₂; 2 – включение некоплементарного нуклеотида в ДНК напротив дефекта (обозначен X) и последующий синтез; 3 – дезактивация PolV в результате переноса RecA-АТФ на субъединицу UmuC.

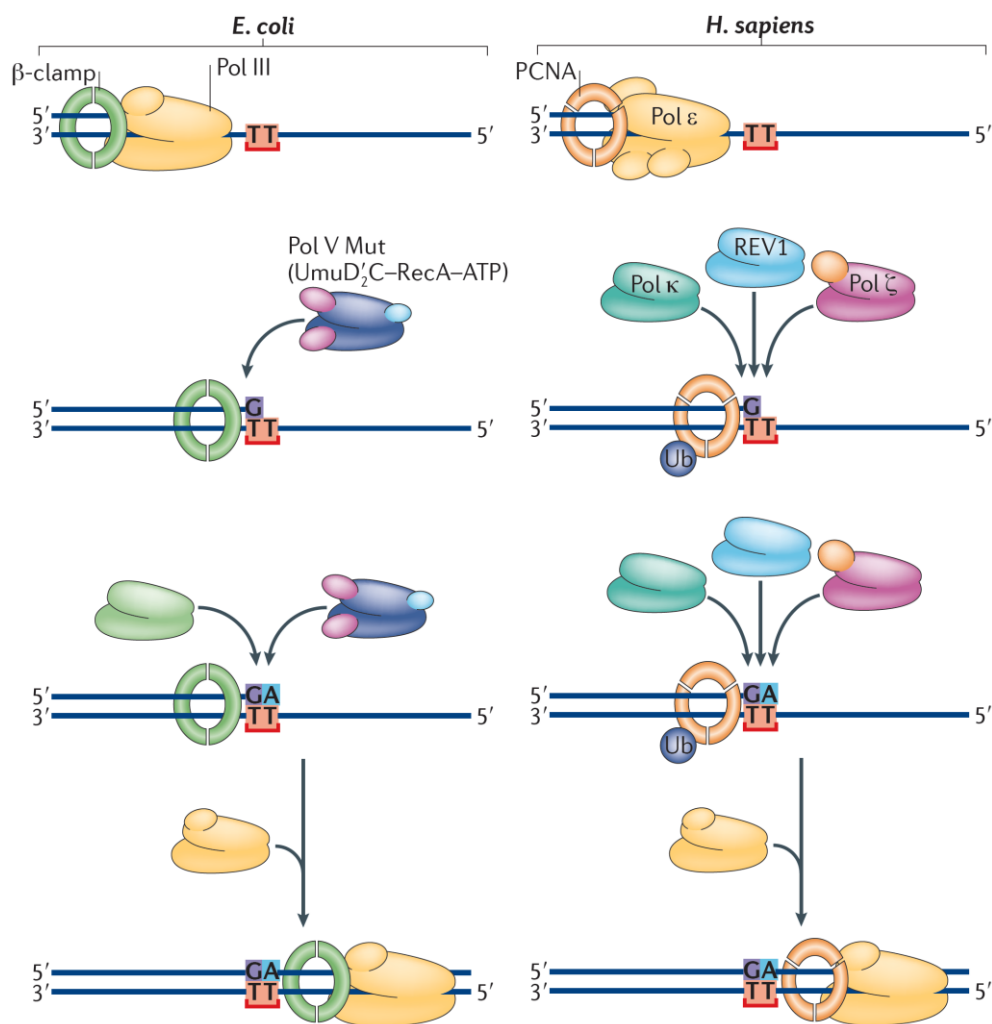


Рис. 2. Схематическое изображение процесса TLS в клетках *E. coli* (а) и *H. sapiens* (б). В бактериях *E. coli* в процессе TLS участвуют лишь активированная полимеразы PolV-RecA*-АТФ и скользящий зажим (β -clamp). В клетках *H. sapiens* происходит двухстадийный процесс с участием скользящего зажима PCNA, одной из Y-полимераз – Pol κ , Pol η , или Pol ι ; В-полимеразы Pol ξ (состоящей из двух субъединиц Rev3/Rev7) и белка Rev1, скрепляющего все компоненты в единую “транслезионосому”. На первой стадии нуклеотид включается напротив дефекта с участием одной из Y-полимераз, а на второй стадии (синтез ДНК сразу после включения нуклеотида) участвует Pol ξ . Заключительная стадия процесса – комплементарный синтез – осуществляется в клетках *E. coli* и *H. sapiens* репликативной ДНК-полимеразой (PolIII – *E. coli*, Pol ϵ – *H. sapiens*).