

УДК 591

АКТИВНОСТЬ СКЛОННОЙ К ОШИБКАМ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ОНТОГЕНЕЗА ДОМОВОЙ МЫШИ *Mus musculus*

© 2008 г. А. В. Макарова, Л. В. Генинг, И. В. Макарова, В. З. Тарантул

Институт молекулярной генетики РАН
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2

E-mail: amakarova-img@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.02.08 г.
Окончательный вариант получен 14.02.08 г.

Анализ некорректной активности склонной к ошибкам ДНК-полимеразы йота в ходе онтогенеза *M. musculus* показал, что ее активность претерпевает значительные изменения, достигая полномасштабного проявления в большинстве органов при внутриутробном развитии организма и снижаясь во взрослом организме. Сделано предположение о том, что при развертывании быстроменяющейся генетической программы в эмбриогенезе млекопитающих важна способность склонных к ошибкам ДНК-полимераз осуществлять синтез в поврежденных участках ДНК, что позволяет снять блок репликации и предотвратить гибель клеток.

Ключевые слова: ДНК-полимераза йота, некорректная активность, повреждения ДНК, гипермутация.

ДНК живых организмов постоянно подвергаются повреждениям, возникающим под действием разнообразных химических и физических факторов. Иногда системы репарации не успевают ликвидировать повреждения до начала очередного раунда репликации. Однако в силу особенностей строения каталитического центра процессивные ДНК-полимеразы, обеспечивающие точную репликацию геномной ДНК, не способны вести синтез в поврежденных участках. Для того чтобы снять блок репликации и предотвратить гибель клеток, природа создала ДНК-полимеразы, имеющие более открытый и толерантный к структуре матрицы каталитический центр, способный осуществлять синтез в поврежденных участках: прокариотические Pol IV (*DinB*) и Pol V (*UmuC*), эукариотические Pol β , Pol ζ , Pol η , Pol ι , Pol κ , Pol λ , Pol μ и REV1. В ряде случаев эти ферменты встраивают напротив повреждения нужный нуклеотид (error-free translesion DNA synthesis), восстанавливая исходную структуру ДНК. Однако эти ДНК-полимеразы неизбежно осуществляют высокоошибочный синтез при использовании в качестве матрицы неповрежденной ДНК, в результате чего частота ошибок возрастает до $10^{-1} - 10^{-3}$ (Johnson et al., 2000a, b; Matsuda et al., 2000; Ohashi et al., 2000; Tissier et al., 2000). За такое поведение эти ферменты были названы склонными к ошибкам (error-prone) ДНК-полимеразами.

Особое место среди склонных к ошибкам ДНК-полимераз занимает ДНК-полимераза йота

(Pol ι). Благодаря особому строению каталитического центра и использованию не уотсон-криковского, а хугстиновского взаимодействия, Pol ι человека обладает набором необычных свойств. Так, она способна выполнять некоторые функции, направленные на сохранение стабильности генома. Например, Pol ι человека может удалять фосфат дезоксирибозы (дезоксирибофосфатлиазная активность), что необходимо для правильного восстановления поврежденного участка ДНК при эксцизионной репарации оснований (Bebenek et al., 2001). Pol ι человека способна также встраивать напротив урацила гуанин, что может быть использовано клеткой для предотвращения транзиций, вызываемых дезаминированием цитозина (Vaisman, Woodgate, 2001; Vaisman et al., 2006). Наконец, этот фермент способен вести синтез напротив целого ряда повреждений ДНК с различной эффективностью и степенью корректности (АП-сайты, разнообразные аддукты пуриновых оснований и др.).

В то же время Pol ι человека обладает самой низкой точностью синтеза неповрежденной ДНК среди всех известных сегодня ДНК-полимераз (McDonald et al., 2001). При этом включение новых нуклеотидов напротив четырех оснований ДНК происходит с различной точностью и эффективностью. Напротив тимина матрицы фермент встраивает dGTP (дезоксигуанозинтрифосфат) (по тому же механизму, что и напротив урацила) в несколько раз эффективнее, чем канонический dATP (дезоксиаденозинтрифосфат) (Zhang et al., 2000).

Напротив пуринов матрицы Pol ι осуществляет более точный и эффективный синтез, чем напротив пиримидинов (Johnson et al., 2000a; Tissier et al., 2000; Zhang et al., 2000; Washington et al., 2004).

Экспрессия многих генов является тканеспецифичной, и профиль экспрессии значительно изменяется в ходе онтогенеза. Известно, что мРНК Pol ι присутствует во всех тканях человека, однако в разном количестве: наибольший ее уровень наблюдается в семенниках, заметное количество содержится в сердце и поджелудочной железе. В организме взрослых мышей максимальное количество мРНК Pol ι также было отмечено в семенниках, незначительный уровень экспрессии имел место в легких, головном мозгу и селезенке (McDonald et al., 1999). мРНК Pol ι была выделена из семенников (BC121199) и клеток гастротомы (DQ102380) *Xenopus tropicalis*, однако каких-либо серьезных попыток оценки экспрессии этого фермента в ходе онтогенеза на сегодняшний день не предпринималось.

Известно, что активность фермента является более полной характеристикой его экспрессии, чем количественное определение мРНК в клетках. Ранее мы предложили вариант метода тестирования биохимической активности Pol ι в грубых экстрактах различных тканей и органов животных, основанный на уникальной способности этой ДНК-полимеразы эффективнее встраивать гуанин напротив тимина матрицы даже в условиях избытка в реакционной смеси dATP (Генинг и др., 2004, 2006а). Грубые экстракты клеток различных органов и тканей животных использовались в качестве ферментных препаратов при проведении ДНК-полимеразной реакции с меченым олигонуклеотидным субстратом. Этот метод был использован и в настоящей работе для анализа экспрессии Pol ι в разные периоды онтогенеза дождевой мыши.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. Тестирование некорректной активности Pol ι в разные периоды онтогенеза проводили на грубых экстрактах органов и тканей дождевой мыши *Mus musculus*. Возраст взрослых животных, использовавшихся для проведения эксперимента, составлял 3 мес, новорожденных – не более 16 ч с момента рождения. Эмбрионы мыши для проведения эксперимента извлекали на 15-й день внутриутробного развития.

Куриные зародыши *Gallus domesticus* использовали для проведения эксперимента на 10-й день эмбрионального развития. Оплодотворенные яйца были приобретены в Московской сельскохозяйственной академии им. К.А.Тимирязева и инкубированы в воздушном термостате при 37°C.

Взрослых животных умерщвляли при помощи дислокации шейных позвонков, новорожденных и эмбрионы – путем декапитации.

Определение активности Pol ι в клеточных экстрактах. Соответствующий извлеченный целый орган или участок ткани промывали охлажденным во льду буфером PBS; mM (2 K₂HPO₄, 10 Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 137 NaCl, 2.7 KCl, pH 7.4), затем измельчали на льду в стеклянном гомогенизаторе с этим же буфером. Объем буфера для гомогенизации брался из расчета 1 мкл на 1 мг гомогенизируемой ткани. Полученный гомогенат центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 14000 g. Супернатант использовали в качестве ферментного препарата.

Для тестирования активности Pol ι использовали два комплементарных олигонуклеотида, которые при гибридизации образуют дуплекс с выступающим 5'-концом: 5'-GGAAGAAGA-AGTATGTT-3' и 3'-CCTTCTTCT-TCATACAATCT-TACTTCTTCC-5' (Zhang et al., 2000).

Мечение с 5'-конца 17-членного олигонуклеотида осуществляли с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и [γ -³³P]АТФ в киназном буфере; mM (50 *tris*-HCl, 10 MgCl₂, 5 ДТТ, 0.1 спермидина, 0.1 ЭДТА, pH 7.6) при 37°C в течение 30 мин. Субстрат для ферментативной реакции получали после отжига в 50 мкл 300 пмоль меченого 17-членного олигонуклеотида с 350 пмоль холодного 30-членного олигонуклеотида в киназном буфере с добавлением NaCl до 100 mM. Отжиг проводили при 73°C в течение 3 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры.

Реакцию осуществляли в 20 мкл смеси, содержащей по 1mM dATP и dGTP, а также 60 пмоль субстрата в буфере Кленова; mM (50 *tris*-HCl, 5 MgCl₂, 1 ДТТ, pH 8.0). К реакционной смеси добавляли 5 мкл экстракта и инкубировали в течение 12 мин при 37°C. Реакцию останавливали охлаждением во льду с последующим добавлением равного объема смеси: 95% формамида; 50 mM ЭДТА; 0.05% бромфенолового синего. Отрицательным контролем служила смесь с субстратом без добавления клеточного экстракта.

По 4 мл смеси использовали для разделения с помощью электрофореза в 18%-ном денатурирующем полиакриламидном геле (длина геля – 60 см, толщина – 0.3 мм) в буфере TBE; mM (89 *tris*-HCl, 89 борной кислоты, 2 ЭДТА, pH 8) при напряжении 5000 В с подогревом геля до начала выхода из него бромфенолового синего. После электрофореза гель дважды выдерживали в фиксирующем растворе в течение 15 мин (10%-ная ледяная уксусная кислота и 30%-ный этанол), сушили на вакуумной сушке для гелей с подогревом в течение 1 ч и делали радиоавтографы с помощью экрана Storage Phosphor Screen (“Molecular Dynamics”, США) в течение 16–24 ч. Автографы

сканировали затем на приборе PhosphorImager Storm 840 (“Amersham Bioscience”, США).

Препарирование новорожденных животных и эмбрионов осуществляли на льду с использованием бинокля Stemi DV4 Zeiss, Германия. Для приготовления суммарного экстракта из определенного органа или ткани соответствующие образцы извлекали из 6–8 эмбрионов или новорожденных мышей и из одного куриного эмбриона.

После электрофоретического разделения продуктов реакции наличие активности Pol ι определяли по присутствию двух радиоактивных полос, соответствующих двум встроенным напротив тимина субстрата 18-членным олигонуклеотидам с аденином или гуанином на 3'-конце, которые характеризуются разной электрофоретической подвижностью. При этом более подвижная нижняя полоса отражала количество олигонуклеотида с 3'-концевым dATP, а верхняя – количество менее подвижного специфического продукта синтеза Pol ι , у которого в 18-м положении напротив тимина матрицы произошло включение dGTP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при исследовании ферментативной активности Pol ι в организме млекопитающих мы показали, что наибольшая активность этой ДНК-полимеразы характерна для экстрактов семенников мышей различных инбредных линий; высокой активностью обладали также экстракты головного мозга, следовая активность фермента детектировалась в экстрактах печени, почек и легких (Генинг и др., 2004, 2006а). Позднее было показано также, что активность Pol ι , сопоставимая по уровню с активностью фермента в семенниках, наблюдается и в яичниках мыши (неопубл. данные). Сходная картина активности фермента во взрослом организме наблюдалась также и для других проанализированных нами представителей млекопитающих, в то время как в экстрактах органов и тканей позвоночных животных, стоящих на более низких ступенях развития, некорректную активность Pol ι , определяемую по встраиванию гуанина напротив тимина матрицы, обнаружить не удалось (Макарова и др., 2008).

Мы предприняли попытку оценить некорректную активность Pol ι в разные периоды онтогенеза *M. musculus*. Представлены результаты эксперимента по тестированию активности фермента в экстрактах различных органов и тканей 15-дневных эмбрионов мыши (рис. 1; 4–9). Из рисунка видно, что во всех проанализированных органах, тканях и частях тела эмбрионов, так же как и в экстрактах семенников, яичников и плаценты мыши, четко детектируется некорректная активность Pol ι по встраиванию гуанина напротив тимина матрицы в 18-м положении олигонуклео-

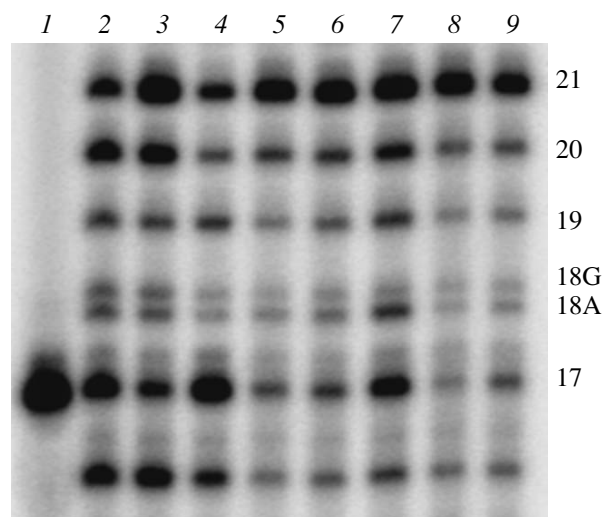


Рис. 1. ДНК-полимеразная активность в экстрактах клеток тканей и органов 15-дневных эмбрионов домашней мыши: 1 – контроль (без добавления экстракта); экстракты: 2 – семенника взрослой мыши, 3 – яичника взрослой мыши, 4 – плаценты, 5 – целых голов эмбрионов, 6 – задней части туловища эмбрионов, 7 – “спинок” эмбрионов, 8 – головного мозга эмбрионов, 9 – фетальной печени.

Цифры справа здесь и далее: 17 – 17-членный 5'-меченый олигонуклеотид; 18А, 18 G, 19, 20, 21 – 18, 19, 20, 21-членные продукты синтеза ДНК соответственно (при этом 18А отражает количество включенного в ходе ДНК-полимеразной реакции dATP напротив тимина матрицы, а 18G – количество включенного dGTP напротив тимина матрицы).

тидного субстрата. Активность фермента присутствует в том числе и в экстрактах печени и “спинок” эмбрионов (рис. 1; 7–9), в то время как у взрослых мышей в печени активность Pol ι была лишь следовой, а в мышечной ткани отсутствовала вовсе (Генинг и др., 2004, 2006а).

Анализ же некорректной активности Pol ι в экстрактах тканей и органов 10-дневного эмбриона курицы (эмбрион был взят на стадии, соответствующей таковой эмбрионального развития *M. musculus*) показал ее полное отсутствие (рис. 2; 2–5), что согласуется с ранее полученными данными по тестированию этой активности в органах и тканях позвоночных животных, стоящих ниже млекопитающих в своем эволюционном развитии (Макарова и др., 2008).

Далее на предмет некорректной активности Pol ι мы изучили экстракты органов и тканей новорожденных мышей (рис. 3; 1–7). Как видно из рисунка, некорректная активность фермента отсутствует в большинстве проанализированных образцов, за исключением экстракта головного мозга новорожденных мышей (рис. 3; 2). Следовательно активность Pol ι была отмечена также в экстракте сердца новорожденных мышей (рис. 3; 6). Эти результаты коррелируют с ранее полученными

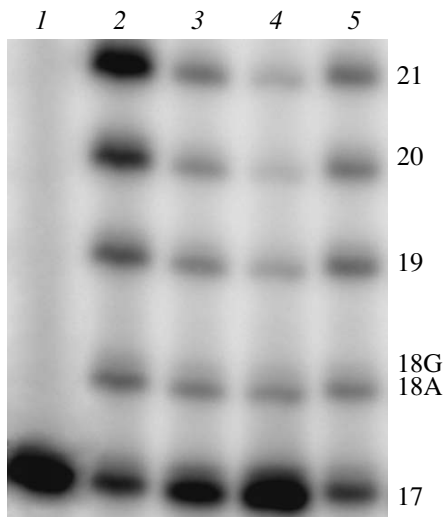


Рис. 2. ДНК-полимеразная активность в экстрактах клеток тканей и органов 10-дневного куриного зародыша: 1 – контроль (без добавления экстракта); экстракты: 2 – фетальной печени, 3 – “спинок” эмбриона, 4 – задней части туловища эмбриона, 5 – головного мозга эмбриона.

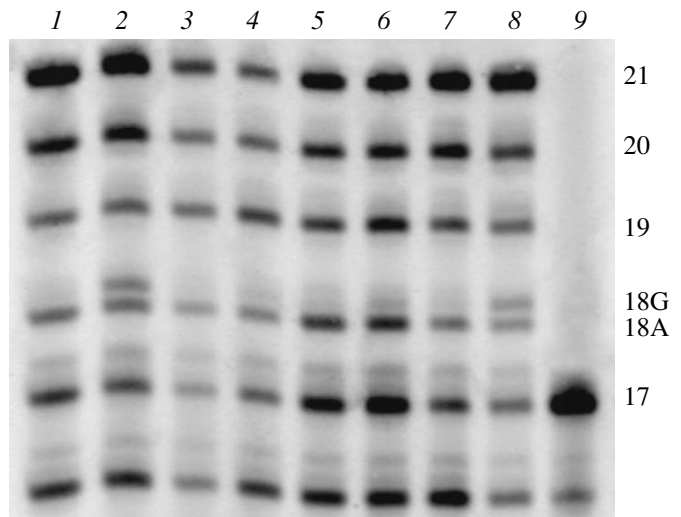


Рис. 3. ДНК-полимеразная активность в экстрактах клеток тканей и органов новорожденных мышей: 1 – семенника, 2 – головного мозга, 3 – тимуса, 4 – печени, 5 – почек, 6 – сердца, 7 – мышечной ткани, 8 – семенника взрослой мыши, 9 – контроль (без добавления экстракта).

ми данными о высоком уровне активности Pol ι в головном мозгу взрослых мышей (Генинг и др., 2004, 2006а).

Таким образом, активность Pol ι в различных тканях организма значительно меняется в ходе онтогенеза, при этом полномасштабное ее проявление наблюдается при внутриутробном развитии организма, а сразу же после рождения активность фермента в большинстве органов резко снижается.

Примечательно, что в семенниках новорожденных мышей активность Pol ι отсутствовала (рис. 3; 1), в то время как в экстрактах семенников взрослых половозрелых особей можно было наблюдать максимальную активность этого фермента по сравнению с другими тканями (рис. 2; 2; рис. 3; 8; см. также: Генинг и др., 2004, 2006а). Следовательно, в зависимости от стадии развития в органах мыши может происходить как снижение, так и повышение активности Pol ι .

Вероятно, функция Pol ι в семенниках взаимосвязана с гаметогенезом, так как самые ранние процессы, связанные со сперматогенезом, у самцов домового мыши начинаются только с 4-х сут жизни (McLean et al., 2003). В пользу этой гипотезы свидетельствуют также ранее полученные данные о том, что наибольший уровень экспрессии гена Pol ι (*Rad30b*) наблюдается в постмейотических круглых сперматиде мыши (McDonald et al., 1999).

Известно, что многие высокоошибочные ДНК-полимеразы, которые вовлекаются в процессы репарации и участвуют в репликации ДНК в поврежденных участках, активно экспрессируются во время мейоза у дрожжей (Budd, Campbell,

1995) и в генеративных клетках: Pol ζ (Van Sloun et al., 1999), Pol η (McDonald et al., 1999; Yamada et al., 2000), Pol κ (Ogi et al., 1999; Schenten et al., 2002), Pol λ (Aoufouchi et al., 2000; Garcia-Diaz et al., 2000). В то же время скорость мутагенеза в мейотических клетках гораздо выше, чем в митотических, и это является следствием рекомбинационных событий (Magni, Von Borstel, 1962). Существуют данные, свидетельствующие о том, что гомологичная рекомбинация приводит к мутациям благодаря участию высокоошибочных ДНК-полимераз (Strathern et al., 1995; Holbeek, Strathern, 1997).

По всей видимости, высокоошибочные ДНК-полимеразы могут вовлекаться в мутагенез в мейотических клетках при репарации разрывов и прохождении повреждений ДНК, происходящих во время рекомбинации. Гомологичная рекомбинация сопровождается как разрывами цепей, так и образованием одноцепочечных участков ДНК. Известно, что одноцепочечная ДНК гораздо больше подвержена повреждениям, чем двухцепочечная. Например, дезаминирование цитозина в одноцепочечной ДНК происходит более чем в 100 раз чаще, чем в двухцепочечной (Federico et al., 1990). Как упоминалось выше, Pol ι способен встраивать гуанин напротив урацила (Vaisman et al., 2001, 2006), и высокий уровень ее активности в семенниках может быть объяснен, в частности, ее участием в снижении количества транзиций, вызываемых дезаминированием цитозина в одноцепочечной ДНК при рекомбинации.

На сегодняшний день Pol ι считается наиболее высокоошибочной ДНК-полимеразой. Полномас-

штабное проявление функции подобного фермента в организме могло бы иметь катастрофические последствия, однако во всех образцах тканей 15-дневных эмбрионов мыши нам удалось наблюдать некорректную активность этой ДНК-полимеразы. Возникает вопрос: так ли опасна активность этого высокоошибочного фермента для организма?

Известно, что дерегуляция и неконтролируемое увеличение активности склонных к ошибкам ДНК-полимераз во взрослом организме ассоциированы со злокачественным перерождением клеток, что скорее всего связано с повышенным уровнем мутагенеза (Canitrot et al., 1998; Srivastava et al., 1999; O-Wang et al., 2001; Bergoglio et al., 2002). Это справедливо и для Pol ι в случаях рака молочной железы (Yang et al., 2004) и увеальной меланомы глаза человека (Генинг и др., 2006б). Однако следует отметить, что опухолеобразование ассоциировано как с повышенной, так и с пониженной экспрессией высокоошибочных ДНК-полимераз (в том числе и со снижением экспрессии Pol ι) (Masutani et al., 1999; Albertella et al., 2005; Ohkumo et al., 2006; Lang et al., 2007).

Очевидно, что для “правильного” развития и функционирования организма очень важен “правильный” баланс между стабильностью и пластичностью генома, между работой склонных к ошибкам и точных ДНК-полимераз. “Антиканцерогенное действие” высокоошибочных ДНК-полимераз связано, по всей видимости, с их вовлечением в процессы репарации повреждений ДНК и способностью ко встраиванию нужного нуклеотида при синтезе ДНК в поврежденных участках.

Высокая активность Pol ι во всех проанализированных органах 15-дневных эмбрионов мыши и снижение этой активности в большинстве органов в постнатальный период свидетельствуют в пользу того, что этот фермент выполняет какие-то определенные функции на ранних этапах и менее важен для взрослого организма.

На ранних стадиях онтогенеза происходит разветвление быстро меняющейся генетической программы развития организма, закладка основных органов и систем органов, интенсивное деление клеток и рост организма. Известно, что общая ДНК-полимеразная активность выше в эмбриональных тканях по сравнению с тканями взрослых организмов (Романенко и др., 1998). В этих условиях накопление повреждений и любая остановка репликации из-за невозможности вести нормальный синтез ДНК в поврежденных участках приводит к гибели (апоптозу) клеток. В свою очередь, в условиях, когда небольшие группы непрерывно делящихся клеток дают начало целым органам, гибель даже отдельных клеток в эмбриогенезе опасна и может привести к гибели всего организма. В связи с этим роль склонных к ошибкам на неповрежденной ДНК, но способных

снимать блок репликации и осуществлять синтез в поврежденных участках ДНК-полимераз (в том числе и Pol ι) будет особенно значима на ранних стадиях онтогенеза животных.

Действительно, известно, что многие склонные к ошибкам ДНК-полимеразы активно экспрессируются в тканях высших эукариот и млекопитающих, выполняя, по-видимому, жизненно важные функции в организме, в том числе и во время эмбриогенеза.

Так, дефицит ДНК-полимеразы зета (Pol ζ) имеет крайне негативные последствия для развития организма: делеция ее субъединицы REV3 является эмбриологической леталью у мышей (Esposito et al., 2000; Wittschieben et al., 2000; O-Wang et al., 2002; Gan et al., 2008). ДНК-полимераза бета (Pol β), высоко экспрессирующаяся в головном мозгу (Rao et al., 2001; Raji et al., 2002), участвует в эксцизионной репарации оснований и осуществляет синтез ДНК в участках, содержащих бреши (Wilson, 1998; Dianov et al., 1999; Sobol et al., 2000; Podlitsky et al., 2001), но также способна с высокой частотой осуществлять делеции и вставки в ДНК (Kunkel et al., 1986). Отсутствие этого фермента в организме эмбриона мыши сопровождается значительным снижением числа мутаций в ДНК клеток головного мозга и интенсивным апоптозом нейронов, содержащих неотрепарированные повреждения, что приводит к тяжелым нарушениям, задержке роста и смерти мышей сразу же после рождения (Sugo et al., 2000; Niimi et al., 2006). Отсутствие значительных аномалий в эмбриональном развитии мышей 129-й линии, у которых была обнаружена нонсенс-мутация во втором экзоне гена *Pol ι* (McDonald et al., 2003), возможно объясняется тем, что эта мутация не приводит к полной инактивации фермента (Генинг и др., 2006а; Gening, Tarantul, 2006).

Таким образом, склонные к ошибкам ДНК-полимеразы, по-видимому, выступают в роли “сторожей” генома на ранних стадиях эмбриогенеза, репарируя ошибки высокоточных ДНК-полимераз и осуществляя синтез ДНК в поврежденных участках.

Очевидно, что склонные к ошибкам ДНК-полимеразы выполняют две основные функции у живых организмов: повышают выживаемость и устойчивость клеток в ответ на действие факторов, повреждающих ДНК, и обеспечивают гипермутацию ДНК. Выгода для живых организмов, с точки зрения пользы для видов, от второй функции, выполняемой высокоошибочными ДНК-полимеразами, возможно, даже более значительна, чем от первой. Вызываемые ими мутации часто оказываются вредными для отдельных особей, приводя к наследственным и раковым заболеваниям, однако мутации необходимы для эволюции

видов и их адаптации в изменяющихся условиях окружающей среды.

Поскольку некорректная активность Pol ι была обнаружена нами ранее только в организме млекопитающих (Макарова и др., 2008), это предполагает ее участие в обеспечении какой-либо специализированной функции, возможно, играющей важную роль в создании эволюционного преимущества класса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Генинг Л.В., Петроченков А.Н., Решетняк А.Б. и др. Активность, характерная для ДНК-полимеразы йота, в экстрактах клеток из разных органов мыши // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 537–543.
- Генинг Л.В., Макарова А.В., Малашенко А.М. и др. Фальшивая нота ДНК-полимеразы йота в ансамбле сторожей генома млекопитающих // Там же. 2006а. Т. 70. С. 201–207.
- Генинг Л.В., Гришина Е.Е., Петроченков А.Н. и др. Ассоциация повышенной активности ДНК-полимеразы йота с развитием увеальной меланомы человека // Генетика. 2006б. Т. 42. С. 98–103.
- Макарова А.В., Тарантул В.З., Генинг Л.В. Эволюция структуры и функции ДНК-полимеразы ι у эукариот // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 426–433.
- Романенко Е. Б., Демиденко З.Н., Ванюшин Б.Ф. РНК-полимеразная, ДНК-полимеразная, ДНК-метилтрансферазная и сфингомиелиназная активности в ядрах печени крыс различного возраста // Там же. 1998. Т. 63. С. 159–163.
- Albertella M.R., Lau A., O'Connor M.J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer // DNA Repair. 2005. V. 4. P. 583–593.
- Aoufouchi S., Flatter E., Dahan A. et al. Two novel human and mouse DNA polymerase of the polX family // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 3684–3693.
- Bebenek K., Tissier A.K., Frank E.G. et al. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota *in vitro* // Science. 2001. V. 291. P. 2156–2159.
- Bergoglio V., Pillaire M.J., Lacroix-Triki M. et al. Deregulated DNA polymerase beta induced chromosome instability and tumorigenesis // Cancer Res. 2002. V. 62. P. 3511–3514.
- Budd M.E., Campbell J.L. Purification and enzymatic and functional characterization of DNA polymerase beta-like enzyme, POL4, expressed during yeast meiosis // Methods Enzymol. 1995. V. 262. P. 108–130.
- Canitrot Y., Cazaux C., Frechet M. et al. Overexpression of DNA polymerase beta in cells results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 12586–12590.
- Dianov G.L., Prasad R., Wilson S.H. et al. Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 13741–13743.
- Esposito G., Godindagger I., Klein Y. et al. Disruption of the Rev-31 encoded catalytic subunit of polymerases zeta in mice results in early embryonic lethality // Curr. Biol. 2000. V. 10. P. 1221–1224.
- Federico L., Kunkel T., Shaw B. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2532–2537.
- Gan G.N., Wittschieben J. P., Wittschieben B. et al. DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes // Cell Res. 2008. V. 18. P. 174–183.
- Garcia-Diaz M., Dominguez O., Lopez-Fernandez L.A. et al. DNA polymerase lambda (pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis // J. Mol. Biol. 2000. V. 301. P. 851–867.
- Gening L.V., Tarantul V.Z. Involvement of DNA-polymerase iota in hypermutagenesis and tumorigenesis: An improper model can lead to inaccurate results // Immunol. Lett. 2006. V. 106. P. 198–199.
- Holbeek S.L., Strathern J. A role for REV3 in mutagenesis during doublestrand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1997. V. 147. P. 1017–1024.
- Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L. et al. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions // Nature. 2000a. V. 406. P. 1015–1019.
- Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S. et al. Fidelity of human DNA polymerase eta // Mol. Biol. 2000b. V. 275. P. 7447–7450.
- Kunkel T.A. Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro* // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 13581–13587.
- Lang T., Dalal S., Chikova A. et al. The E295K DNA polymerase beta gastric cancer-associated variant interferes with base excision repair and induces cellular transformation // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. P. 5587–5596.
- Magni G., Von Borstel R. Different rates of spontaneous mutation during mitosis and meiosis in yeast // Genetics. 1962. V. 47. P. 1097–1108.
- Masutani C., Kusumoto R., Yamada A. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta // Nature. 1999. V. 399. P. 700–704.
- Matsuda T., Bebenek K., Masutani C. et al. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase-eta // Ibid. 2000. V. 404. P. 1011–1013.
- McDonald J.P., Rapic-Otrin V., Epstein J.A. et al. Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta // Genomics. 1999. V. 60. P. 20–30.
- McDonald J.P., Tissier A., Frank E.G. et al. DNA polymerase iota and related rad30-like enzymes // Philos. Trans. Roy. Soc. (Lond. B. Biol. Sci.) 2001. V. 356. P. 53–60.
- McDonald J.P., Frank E.G., Plosky B.S. et al. 129-Derived strains of mice are deficient in DNA polymerase ι and have normal immunoglobulin hypermutation // J. Exp. Med. 2003. V. 198. P. 635–643.
- McLean D.J., Friel P.J., Johnston D.S. et al. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice // Biol. Reprod. 2003. V. 69. P. 2085–2091.
- Niimi N., Sugo N., Aratani Y. et al. Decreased mutant frequency in embryonic brain of DNA polymerase beta null mice // Mutagenesis. 2006. V. 21. P. 55–59.

- Ogi T., Kato T., Jr., Kato T. et al. Mutation enhancement by DINB1, a mammalian homologue of the *Escherichia coli* mutagenesis protein dinB // *Genes Cells*. 1999. V. 4. P. 607–618.
- Ohashi E., Bebenek K., Maturda T. Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene // *Biol. Chemistry*. 2000. V. 275. P. 39678–39684.
- Ohkumo T., Kondo Y., Yokoi M. et al. UV-B radiation induces epithelial tumors in mice lacking DNA polymerase eta and mesenchymal tumors in mice deficient for DNA polymerase iota // *Mol. Cell. Biol*. 2006. V. 26. P. 7696–7706.
- O-Wang J., Kawamura M., Tada Y. DNA polymerase kappa, implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer // *Cancer Res*. 2001. V. 61. P. 5366–5369.
- O-Wang J., Kajivara K., Kawamura K. et al. An essential role of REV3 in mammalian cell survival: absence of REV3 induced p53-independent embryonic death // *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 2002. V. 293. P. 1132–1137.
- Podlitsky A.J., Dianova I.I., Podust V.N. et al. Human DNA polymerase β initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 1477–1482.
- Raji N.S., Krishna T.H., Rao K.S. DNA-polymerase alpha, beta, delta and epsilon activities in isolated neuronal and astroglial cell fractions from developing and aging rat cerebral cortex // *Int. J. Devel. Neurosci*. 2002. V. 20. P. 491–496.
- Rao K.S., Annapurna V.V., Raji N.S. DNA polymerase-beta may be the main player for defective DNA repair in aging rat neurons // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2001. V. 928. P. 113–120.
- Schenten D., Gerlach V.L., Guo C. et al. DNA polymerase kappa deficiency does not affect somatic hypermutation in mice // *Eur. J. Immunol*. 2002. V. 32. P. 3152–3160.
- Sobol R.W., Prasad R., Evenski A. et al. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage induced cytotoxicity // *Nature*. 2000. V. 405. P. 807–810.
- Srivastava D.K., Husain I., Artcaga C.L. et al. DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines // *Carcinogenesis*. 1999. V. 20. P. 1049–1054.
- Strathern J., Shafer B., McGill C. DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair // *Genetics*. 1995. V. 140. P. 965–972.
- Sugo N., Aratani Y., Nagashima Y. et al. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 1397–1404.
- Tissier A., McDonald J.P., Frank E.G. et al. Pol iota, a remarkably error-prone human DNA polymerase // *Genes Devel*. 2000. V. 14. P. 1642–1650.
- Vaisman A., Woodgate R. Unique misinsertion specificity of poliota may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines // *EMBO J*. 2001. V. 20. P. 6520–6529.
- Vaisman A., Takasawa K., Iwai S. et al. DNA polymerase iota-dependent translesion replication of uracil containing cyclobutane pyrimidine dimers // *DNA Repair (Amst.)*. 2006. V. 5. P. 210–218.
- Van Sloun P.P., Romeijn R.J., Ecken J.C. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of the mouse Rev31 gene, encoding the catalytic subunit of polymerase zeta // *Mutat. Rev*. 1999. V. 433. P. 109–116.
- Washington M.T., Johnson R.E., Prakash L. et al. Efficient and error-free replication past a minor-groove DNA adduct by the sequential action of human DNA polymerases iota and kappa // *Mol. Cell. Biol*. 2004. V. 24. P. 5687–5693.
- Wilson S.H. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta // *Mutat. Res*. 1998. V. 407. P. 203–215.
- Wittschieben J., Shivji M.K., Lalani E. et al. Disruption of the developmentally regulated Rev31 gene causes embryonic lethality // *Curr. Biol*. 2000. V. 10. P. 1217–1220.
- Yamada A., Masutani C., Iwai S. Complementation of defective translation synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase eta // *Nucl. Acids Res*. 2000. V. 28. P. 2473–2480.
- Yang J., Zhiwen C.H., Liu Y. Altered DNA polymerase τ expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis // *Cancer Res*. 2004. V. 64. P. 5597–5607.
- Zhang Y., Yuan F., Wu X. et al. Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase iota // *Mol. Cell. Biol*. 2000. V. 20. P. 7099–7108.

Activity of Error-Prone DNA Polymerase Iota in Different Periods of House Mouse *Mus musculus* Ontogeny

A. V. Makarova, L. V. Gening, I. V. Makarova, and V. Z. Tarantul

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 123182, Russia

e-mail: amakarova-img@yandex.ru

Abstract—Analysis of incorrect activity of error-prone DNA polymerase iota in *M. musculus* ontogeny demonstrated considerable changes in its activity, which peaks in most organs during prenatal development and decreases in the adult body. We propose that the capacity of error-prone DNA polymerases to synthesize on damaged DNA regions is critical for the realization of rapidly changing genetic program in mammalian embryogenesis, which relieves the replication block and prevents cell death.

Key words: DNA polymerase iota, incorrect activity, DNA damage, hypermutagenesis.