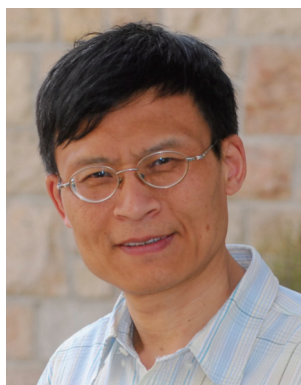


DOI: 10.13376/j.cblls/2014163

文章编号: 1004-0374(2014)11-1143-14



萧 伟 教授

萧伟, 博士, 教授, 首都师范大学生命科学学院院长, 国家第二批千人计划, 同时任加拿大 Saskatchewan 大学兼职教授, 2011 年被聘为国家特聘专家。

泛素 (Ubiquitin, Ub) 是一种高度保守的小蛋白 (76 个氨基酸), 普遍存在于从单细胞酵母到人类的所有真核细胞内, 并且表达水平很高。通过一系列的酶促反应连接到目的蛋白, 从而被单泛素化或多泛素化修饰, 结合有 Lys48 链连接的多聚泛素目的蛋白被 26S 蛋白酶体降解。2004 年的诺贝尔生理学或医学奖授予“泛素化的发现和它在蛋白降解中的作用”就说明了它的重要性。随后又发现 Lys63 链连接的多泛素化修饰, 在所有生物中发现的泛素结合酶中, 只有 Ubc13 能够专一通过 Lys63 连接泛素; 重要的是, 被 Lys63 链连接的多泛素化修饰的目的蛋白不是为了降解, 而是为了改变其活性, 这一新颖的蛋白质活性调节机制, 拓宽了人们对泛素化功能的认识。本实验室的主要兴趣在于发现上述非常规泛素化过程和探索相关途径的分子机制, 如 DNA 损伤耐受、细胞周期检验点、天然免疫和应激反应, 而且这些过程在人类疾病中起关键作用, 如癌症、抗病及衰老, 所以, 这项研究将会对包括癌症在内的多种疾病诊断和治疗产生直接影响。

受PCNA翻译后修饰调控的DNA损伤耐受机制

秦周帅, 张传林, 萧 伟*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘 要: 为了应对 DNA 损伤复制阻滞, 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)164 位点的赖氨酸残基能够发生一系列的泛素化修饰并介导两种不同的损伤耐受机制, 即 DNA 跨损伤合成 (TLS) 和无缝耐受通路。目前, 单泛素化的 PCNA 介导 DNA 跨损伤合成通路, 而多泛素化的 PCNA 介导无缝耐受通路这一观点已被普遍认可。另外, PCNA 的 164 位点还能被泛素类似物小蛋白 (SUMO) 修饰, 从而抑制 DNA 双链断裂重组。总结 PCNA 的翻译后修饰及其在 DNA 损伤应答过程中的作用机制, 有助于我们了解 PCNA 在 DNA 损伤耐受机制中的中心作用。重点总结 PCNA 的翻译后修饰如何调控真核生物 DNA 损伤应答的不同途径。

关键词: 增殖细胞核抗原; 跨损伤合成; DNA 损伤耐受; 泛素

中图分类号: Q75; Q813 **文献标志码:** A

DNA damage tolerance controlled by PCNA post-translational modifications

QIN Zhou-Shuai, ZHANG Chuan-Lin, XIAO Wei*

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: In response to replication-blocking lesions, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) can be sequentially

收稿日期: 2014-09-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2013CB911003); 首都师范大学211特殊基金 (10531182313)

*通信作者: E-mail: wei.xiao@usask.ca

ubiquitinated at the K164 residue, leading to two modes of DNA-damage tolerance (DDT), namely, translesion DNA synthesis (TLS) and error-free lesion bypass. It is generally believed that monoubiquitinated PCNA promotes TLS, whereas polyubiquitinated PCNA mediates an error-free mode of lesion bypass. In addition, PCNA can also be sumoylated at the same K164 residue to inhibit double-strand break recombination. Understanding PCNA post-translational modifications and their implications reveals the central role of PCNA in regulating DDT. In this review, we describe how PCNA post-translational modifications mediate different mechanisms of DDT in response to lethal DNA damage in eukaryotes, from yeast to human.

Key words: PCNA; translesion DNA synthesis; DNA-damage tolerance; ubiquitin

增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是 1978 年在系统性红斑狼疮患者血清中首次发现并命名, 之后研究发现其与细胞 DNA 合成密切相关, 并在细胞增殖中起重要作用。PCNA 蛋白大小为 36 kDa, 主要存在于细胞核, G0-G1 期没有明显表达, G1 晚期迅速增加, S 期达到高峰, G2-M 期明显下降, 所以最初被认定为周期蛋白。对 PCNA 研究热潮的掀起, 是由于其在细胞增殖中起重要作用, 与肿瘤细胞有一定的相关性, 并且在 DNA 损伤修复中起非常重要的作用^[1-3]。

行使功能的 PCNA 是一个同源三聚体, 3 个 PCNA 单体相接形成一个环状结构并有两个平面, PCNA 单体 N 端和 C 端首尾连接处在一个平面, 其对应平面有 β 发夹结构。PCNA 的环状三聚体结构在进化上高度保守, 内环富含大量赖氨酸和精氨酸, 带正电荷的碱性氨基酸易于与带负电的双螺旋 DNA 结合^[4]。2007 年, Moldovan 等^[5]研究表明, 真核细胞中 PCNA 不仅在 DNA 复制中起非常重要的作用, 而且在 DNA 损伤应答通路中也有不可或缺的作用。研究证明, 许多不同 DNA 损伤药剂和 UV 损伤处理都会造成 PCNA 翻译后修饰, 并且这些翻译后修饰通常发生在 PCNA 的 164 位点的赖氨酸残基上。泛素化的 PCNA 调节跨损伤合成 (TLS), 其中需要多个 TLS 聚合酶参与, 如 Pol η 、Pol ι 、Pol κ 、Rev1、Pol ζ 等^[6-9]。PCNA 翻译后修饰募集 TLS 聚合酶到 DNA 损伤位点, 关于这个过程的具体机制仍然还不清楚, 尤其是对于 PCNA 的翻译后修饰参加 DNA 损伤的无错耐受更是知之甚少。本文主要就 PCNA 翻译后修饰所调节的一系列 DNA 损伤耐受机制进行归纳与总结。

1 DNA损伤与PCNA修饰

活体生物组织或细胞维持正常生命状态, 经常受到各种各样来源的 DNA 损伤压力, 其中包括物理化学因素, 如各种射线和生化试剂等, 还有细胞

自身新陈代谢和氧化反应等。一些类型的 DNA 损伤, 如 UV- 射线或是化学药剂都会干扰 DNA 正常复制, 损伤的 DNA 无法通过传统聚合酶完成复制, 因此造成复制叉停滞。在正常情况下, 大多数损伤的 DNA 能够通过切除等方式被修复, 一旦 DNA 损伤过度从而导致损伤的 DNA 无法在 S 期修复, 将会造成很严重的后果, 比如基因组不稳定, 甚至细胞死亡。所以, 细胞和机体组织进化出各种精密的系统来应对各种 DNA 损伤。当 DNA 复制停滞时, 为了保证 DNA 复制顺利完成, 系统可以启动 DNA 损伤耐受 (DNA-damage tolerance, DDT) 或称为复制后修复 (DNA post-replication repair, PRR) 通路, 大致分为无错耐受和跨损伤合成 (TLS), TLS 又可进一步分为易错 TLS 和无错 TLS。不同的损伤耐受机制都需要 PCNA 参与。PCNA 可以被泛素 (Ub) 修饰也可以被泛素类似物小蛋白 SUMO 修饰, PCNA 的不同修饰调控 PCNA 参与 DNA 的不同损伤耐受机制。图 1 系统地总结了 PCNA 不同的共价修饰类型及其功能。

1.1 PCNA泛素化修饰

泛素是一种广泛存在于真核细胞中的小蛋白, 它的主要功能是标记不同蛋白质, 改变蛋白质活性或功能, 参与底物蛋白水解过程或信号通路。泛素由 76 个氨基酸组成, 相对分子质量大约 8.5×10^3 。它在真核生物中高度保守, 人类和酵母的泛素有 96% 的相似性。泛素化即蛋白质上的一个赖氨酸残基与泛素 C 末端的保守的甘氨酸残基之间形成共价连接的一个共价结合过程, 这一过程是一个三级酶联反应, 即需要有 3 个酶的参与: 泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3^[10]。大多数细胞机体里有一个 E1、多个 E2 和多个 E3^[11], 底物蛋白可以结合一个泛素分子被单泛素化, 也可以结合多个泛素分子形成的泛素链被多泛素化。一般认为在多泛素过程中必须依赖于底物单泛素化, 然而, 在泛素的延伸方式中, 到底是泛素一个接一个有顺序

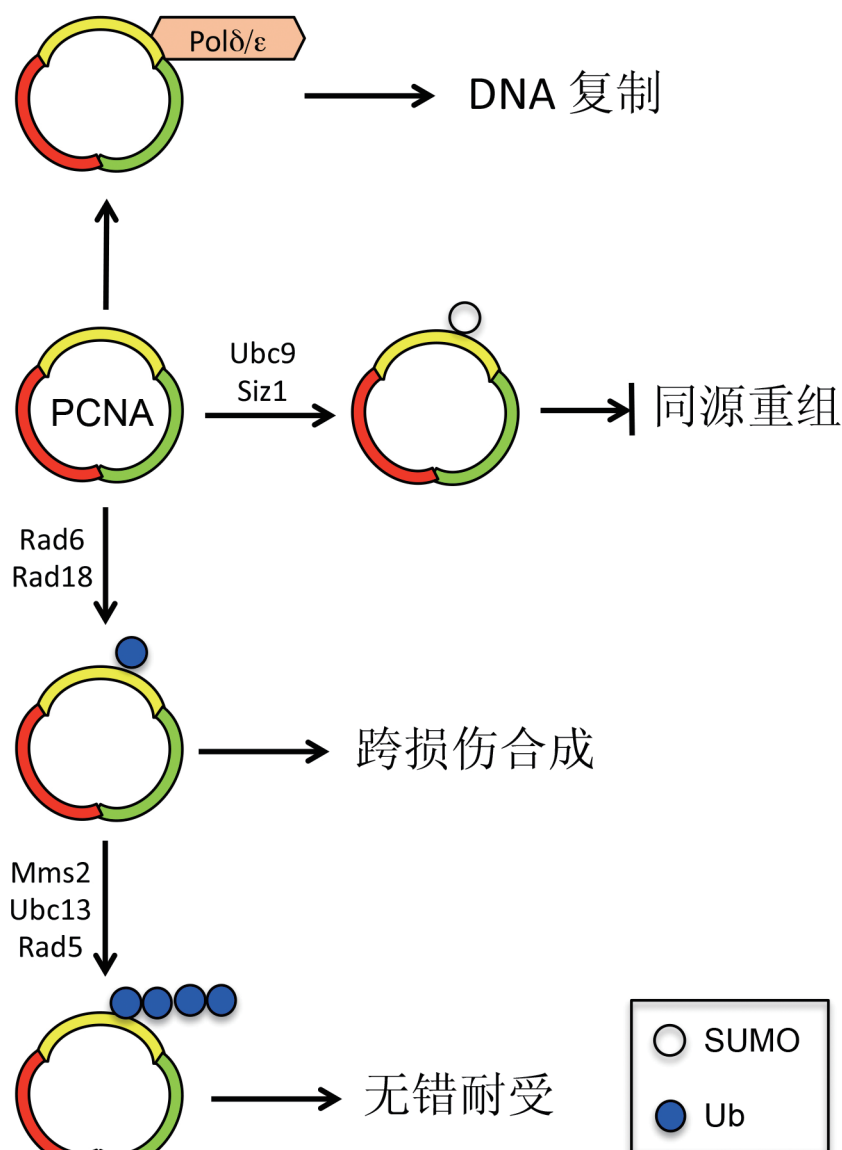


图1 以酵母为例总结不同PCNA共价修饰与其功能

地加入还是直接接入一个泛素链至今也没有明确结论^[12-13];并且在泛素链形成过程中,泛素表面上的7个赖氨酸(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)都可以参与泛素链的形成,但是它们在细胞中参与的生物学功能并不完全清楚^[14-15]。研究比较清楚的泛素化修饰是K48连接的经典泛素化修饰,主要参与蛋白酶体降解途径。另一种是K63连接的泛素化修饰,不同于K48链,K63链在大多数情况下并不参与依赖蛋白酶体降解途径的降解作用,而是参与各种不同的信号通路。

1.1.1 PCNA单泛素化修饰

目前许多研究表明,PCNA泛素化修饰作为DNA损伤应答的重要信号,对于DNA损伤修复过

程具有极为重要的意义。PCNA单泛素化修饰即PCNA的164位点的赖氨酸与一个泛素C端的甘氨酸共价结合,这一过程需要E2、E3复合物的参与。许多研究表明,Rad6与Rad18形成一个复合物共同参与PCNA泛素化修饰。Rad6作为E2参与DNA损伤修复,这一过程依赖于E3泛素连接酶Rad18^[16-18]。Rad18N端的RING指结构域并不参与结合Rad6^[19-20],而是依赖于Rad18上的Rad6结合结构域(R6BD),此结构域比较保守,在酵母Rad18中是371~410共40个氨基酸^[21],在人类细胞Rad18中是340~395共56个氨基酸^[7]。在体外实验中,纯化的人类细胞中的Rad18和Rad6蛋白能够使PCNA泛素化。在过表达Rad18时明显增加

PCNA 的单泛素化修饰, 并且在下调 Rad6 或敲除 *RAD18* 能使 PCNA 泛素化程度降低或消失^[6-7,22]。无论是在酵母还是哺乳动物细胞中, Rad18 都能结合单链 DNA, 这一过程很可能是由与 DNA 单链结合的解旋蛋白 A(RPA) 介导的^[16,23]。

PCNA 泛素化修饰的诱因有很多种, 如化学试剂甲磺酸甲酯 (MMS)、丝裂霉素 C(MMC)、羟基脲 (HU) 和苯比 (a) 芘 -7,8- 二氢二醇 -9,10- 环氧化物 (BPDE) 等, 还有 UV 诱导的环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 和 6-4 光产物二聚体 (6-4PP) 等^[6,24]。细胞本身的复制压力和自发的 DNA 损伤也能诱导 PCNA 泛素化, 如在酵母中下调 Pol δ 的一个非必需亚基 Pol32 能够增加 PCNA 泛素化水平^[25]。PCNA 泛素化在未经损伤处理的细胞中也能检测出来^[26-27], 这可能由于细胞内部存在的高频率自发的 DNA 损伤或者是由于个别细胞的功能缺陷造成的。

单泛素化是一个可逆过程^[28], 有一类去泛素化酶 (DUBs) 特意地去除被修饰的底物蛋白上的泛素分子, Usp1 就是其中一个重要的去泛素化酶, 专门去除 PCNA 上的泛素化修饰^[29]。UV 损伤处理降低了 Usp1 的水平, 因此增加 PCNA 泛素化水平^[30], 在细胞中无论是敲除还是下调 Usp1, PCNA 的泛素化修饰都能增加^[27], 并不是所有 PCNA 泛素化程度高的时候都会导致 Usp1 表达量的下调, 在 MMS 或 MMC 处理细胞时就不能检测到 Usp1 的水平下调^[24], 可能不同的损伤有不同的机制, 有的并不是通过下调 Usp1 来增加 PCNA 的泛素化水平的, 而是通过调节 Usp1 的分子伴侣来调节去泛素化, 如 UAF1^[30]。

1.1.2 PCNA多泛素化修饰

PCNA 多泛素化修饰也是发生在 PCNA 的 164 位点的赖氨酸残基上, 在 DNA 损伤无错耐受中起作用的主要是 Mms2-Ubc13-Rad5 复合物介导的 K63 形式的多聚泛素化修饰^[31]。Mms2 是 Ubc 变体 UEV 家族中很重要的一个蛋白质, 与其他 Ubc 蛋白有很高的相似性, 因缺少与泛素结合的半胱氨酸活性位点而不具有泛素结合酶活性, 必须与完整的 E2 结合共同发挥介导 K63 链的多聚泛素化的形成^[32-34]。Ubc13 是唯一一个已知的介导 PCNA 的 K63 链泛素化修饰的 E2, 但它的酶活性需要 UEV 的参与^[35]。Rad5 属于 SWI/SNF 超家族, 是含有 RING 结构域的 E3, 参与 PCNA 多泛素化的形成^[31]。在 PCNA 多泛素化修饰过程中, Rad6-Rad18 和 Mms2-Ubc13-Rad5 两个复合物都是必需的, 这一观点被普遍认可并在酵母中得到证明。在 DNA 损伤

情况下, 改变 Rad6 的表达不仅影响 PCNA 单泛素水平而且影响 PCNA 的多泛素化水平。在酵母 *UBC13*、*MMS2* 或 *RAD5* 缺失的突变体里, DNA 损伤药物处理不能诱导 PCNA 多泛素化, 而 PCNA 单泛素化程度不受影响^[31]。

1.2 PCNA的SUMO化修饰

SUMO 是与泛素类似的小蛋白分子, 与泛素具有 18% 的同源性, 在高级结构中两者具有类似的三维结构。SUMO 通过 SUMO 化修饰改变底物蛋白的活性、结构等。SUMO 化过程首先被 SUMO 激活酶 E1 激活, 然后转移到 SUMO 结合酶 E2 (Ubc9) 上, 最后在 SUMO 连接酶 E3 的参与下, SUMO 分子从 Ubc9 转移到底物分子上^[36]。与泛素类似, SUMO 也是连接到底物分子的赖氨酸残基上^[37], 但其并不参与蛋白质降解过程, 而是参与细胞调节和新陈代谢过程, 如转录调节、核内运输、细胞凋亡和蛋白质稳定性等^[38]。

在酵母中, PCNA 的 SUMO 化修饰发生在 127 和 164 位点的赖氨酸, 如果把这两个位点全部突变掉则 PCNA 无法被 SUMO 所修饰^[39]。PCNA 上能被 SUMO 修饰的 127 位点的赖氨酸是一个疏水残基, 它只存在酵母中的 PCNA; 相比之下, PCNA 的 164 位点的赖氨酸是主要的修饰位点, 不但能够被泛素化修饰也能被 SUMO 修饰, 而且普遍存在于酵母和哺乳动物细胞中^[40]。PCNA 形成同源三聚体的环状结构环绕 DNA, 127 和 164 这两个位点都位于环状结构的外侧^[41], 127 位点定位于 PCNA 上连接两个单体的环上, 这个环的结构与聚合酶的结合有关^[42-43]。

不少研究都在探究泛素化修饰和 SUMO 化修饰的关系^[44], 在 PCNA 修饰过程中, 这两种修饰都是连接到同一个位点的赖氨酸, 所以现在有一个假设: 在 PCNA 的 164 位点的赖氨酸位置, SUMO 化修饰是泛素化修饰的竞争抑制因素^[45]。PCNA 的 SUMO 化修饰不仅影响 PCNA 的泛素化修饰, 而且影响底物蛋白的其他功能。在细胞中泛素化和 SUMO 化都是一个可逆的过程^[37,46], 有很精密的调节机制调节底物蛋白的泛素化和 SUMO 化, 也许泛素化修饰和 SUMO 化修饰的转化机制在细胞中是广泛存在的, 有待我们进一步研究。

PCNA 的 SUMO 化修饰抑制同源重组。在酵母中, SUMO 化的 PCNA 通过 Srs2 C 端的与 SUMO 结合的结构域招募 Srs2^[47], 然后, Srs2 通过抑制 Rad51 的功能降低细胞中同源重组频率。如果在

RAD18^{-/-}的细胞系中表达带有164位点突变的PCNA,也就是在排除PCNA泛素化的情况下,PCNA不能被SUMO化修饰,会增加细胞中的双链断裂^[48]。表达PCNA-SUMO融合蛋白同样也能够抑制由于DNA损伤复制停滞引起的DNA双链断裂,从而抑制同源重组^[49-51]。所以,PCNA被SUMO化修饰主要是通过抑制不必要的同源重组来保持基因组的稳定性。

2 PCNA单泛素化在DNA跨损伤合成(TLS)机制中的作用

细胞在维持基因组的稳定性过程中进化出一系列精密的DNA损伤耐受机制,这种机制并不是修复模板DNA上的损伤位点,而是跨过损伤位点完成整个DNA复制。在这种机制中起主要作用的是一种特殊的聚合酶,即DNA跨损伤合成(TLS)聚合酶,它可以以损伤的DNA为模板合成DNA使DNA复制继续进行^[52]。TLS聚合酶普遍存在于原核以及真核生物中,并且具有一定的保守性^[53]。

虽然A、B、X家族的聚合酶在某些特殊的情况下也能介导DNA跨损伤合成^[54-55],但是大部分的TLS聚合酶属于Y家族聚合酶。这些聚合酶对DNA模板的要求相对宽松,可以以损伤的DNA为模板,在损伤位点对面加上核苷酸使DNA复制继续进行,然而,这种酶缺少3'→5'外切酶活性,因此,DNA复制的保真性很低,大大增大了DNA复制时引入突变的频率^[56]。DNA跨损伤合成大致需要两步来完成,第一是插入过程,第二步是延伸过程。在插入过程中,TLS聚合酶保真性较低,从而在损伤位点对应位置插入碱基具有一定的易错性,接下来在损伤位点之后继续延伸^[52]。

在DNA损伤情况下,正常的DNA聚合酶不能完成DNA损伤处的复制,于是复制叉停滞在损伤位点,PCNA的164位点赖氨酸在Rad6-Rad18复合物的作用下被单泛素化。PCNA通过单泛素化修饰调节TLS聚合酶与复制性聚合酶的转换,利用TLS聚合酶缺少3'→5'外切酶活性的特性,插入核苷酸使DNA合成继续进行^[7]。这一过程中TLS聚合酶上与泛素结合的结构域至关重要,泛素化的PCNA与TLS聚合酶有更高的亲和性,把它们募集到损伤位点,目前有几个酵母和哺乳动物细胞的TLS聚合酶被发现并被具体研究,包括Polη、Rev1、Polζ、Polκ、Polι^[57]。这些低保真性的聚合酶可以以错误的DNA为模板进行DNA合成,在DNA合

成过程中并没有移除原本的损伤。不同的损伤由不同的TLS聚合酶参与修复,不同的TLS聚合酶其合成保真度有很大区别,如Polη在跨越UV损伤产生的胸腺嘧啶二聚体时保真度较高,相比之下Polζ对于同样DNA损伤会引入更多的突变^[58-59]。在哺乳动物细胞中,Rev1、Polη、Polκ、Polι都能与泛素化的PCNA共定位^[60]。

哺乳动物细胞中已发现四个Y家族聚合酶,包括Polη、Polκ、Polι和Rev1。酵母中有两个Y家族聚合酶,即Rad30(Polη)和Rev1^[61-62]。在这些聚合酶中都有一个或两个与泛素结合的结构域UBM或UBZ,以便与泛素化的PCNA结合^[63]。Polη、Polκ、Polι这3个聚合酶中都有与PCNA结合的PIP结构域和与Rev1结合的RIR结构域^[60,64-66]。Rev1则通过C端与其他聚合酶结合^[67-69]。图2系统地显示TLS聚合酶的结构域,图3总结在不同情况下TLS聚合酶的作用与分工。下面分别介绍每一种TLS聚合酶。

2.1 Polη

Polη在酵母中称为Rad30,在人细胞中被称为XPV。如果以没有损伤的DNA为模板,它在DNA复制过程产生高达 10^{-2} ~ 10^{-3} 的突变率^[52],但它能够准确地跨越由UV损伤造成的环丁烷嘧啶二聚体(CPD)^[59,70],这主要因为它的特殊高级结构有更大的空间能够结合嘧啶二聚体,然后在其对应位置插入腺嘌呤(A)。在哺乳动物细胞和酵母中,Polη还能准确高效地跨越8-oxo-G损伤类型,并使DNA复制继续延伸^[71-72];也有体外实验研究表明,Polη抑制这种损伤类型的易错修复途径^[73],Polη还能跨越m6G^[74]和奥沙利铂、顺铂造成的GpG损伤类型^[75-76],而且在哺乳动物细胞中Polη可以无错地跨越GpG损伤类型。然而,对于BPDE-dG损伤类型,在体外实验中Polη更容易加入错误的G或A来替代正确的C^[77],这在体内实验也得到一致的结果,如果在人细胞中敲除Polη,则会大大降低细胞中由于TLS修复BPDE-dG损伤产生的高突变率^[75]。

在Polη上有很多结构域有助于它参与TLS途径,在Polη的N端有一个聚合酶结构域^[78-79],在靠近C端有一个与泛素结合的UBZ结构域,它在Polη与泛素化的PCNA相互作用时起非常重要的作用^[63]。在Polη上发现了两个与Rev1结合的结构域,分别是509~557位和369~491位氨基酸^[69,80]。在Polη的C端也存在与PCNA相互作用的PIP结构域^[9],后来在UBZ结构域的上游又发现一个类似

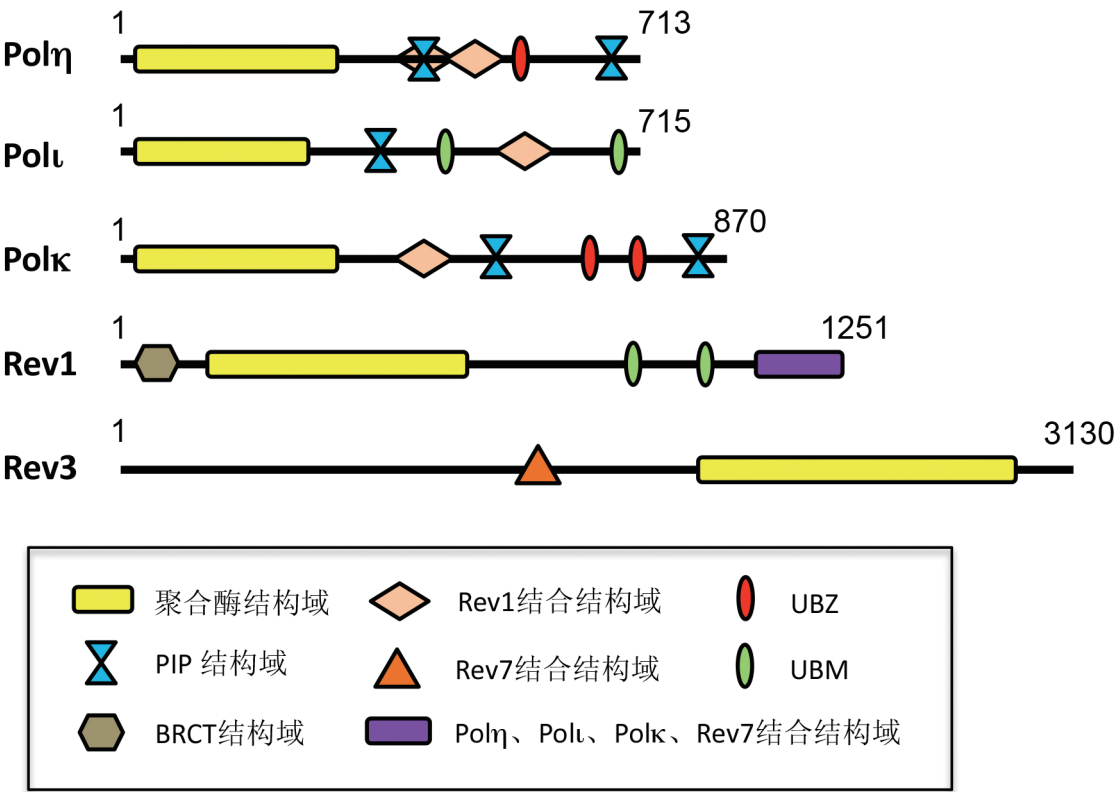


图2 TLS聚合酶结构示意图

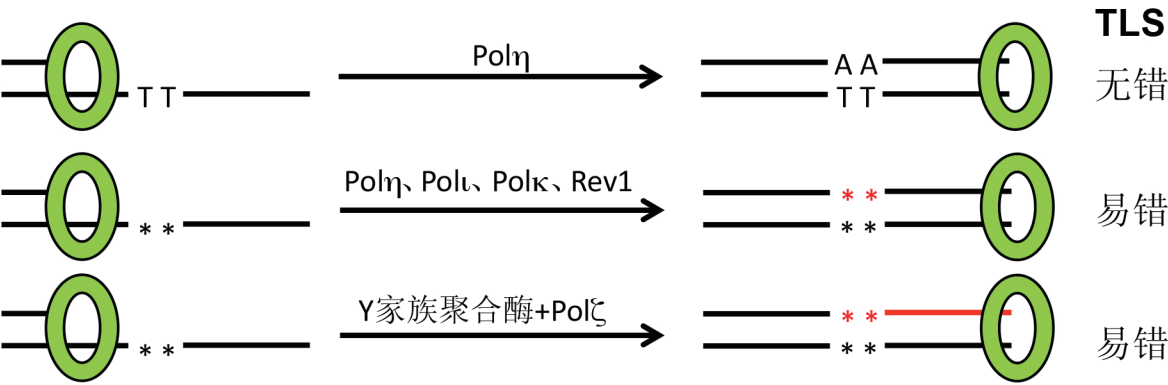


图3 跨损伤合成示意图

PIP 的结构域，并且在哺乳动物细胞中，这个结构域在 Polη 参与 TLS 途径起了非常重要的作用^[65]。在一些 DNA 损伤情况下 Polη 被募集到损伤位点，是由于它与泛素化的 PCNA 有更高的亲和性^[81-83]。也有研究表明，PCNA 泛素化在 Polη 形成聚集点 (nuclear foci) 过程中非常重要，但不是必需因素^[84]。含有 UBZ (H650A、C635A) 突变的 Polη 依然能够形成聚集点，但是含有 UBZ (D652A、H654A、F655A) 突变的 Polη 功能就消失了，很有可能后面这些位点影响的不仅是 Polη 的 UBZ 结构域的功能，还影响

Polη 的其他功能^[65]。

2.2 Rev1

从酵母到哺乳动物细胞中，Rev1 在跨损伤修复通路易错修复中占据中心位置。在体外试验中，Rev1 也有聚合酶活性，可以在 G 或损伤位点对面加入 C，因此，它又称为 dCMP 转移酶^[85]。Rev1 无论模板是 A、T，还是 C 时都能在对面加入 dCMP^[86]，形成错配修复，这种错配修复依靠的是 Rev1 自身结构上的精氨酸，被插入的碱基并不是跟 DNA 双螺旋的碱基互补配对，而是和 Rev1 自身

的精氨酸结合^[87]。Rev1 还能够在碱基缺失损伤类型或尿嘧啶对面高效专一地加入 dCMP, 但是它不能修复 CPD 和 6-4 光产物二聚体^[86,88-89]。

Rev1 参与 TLS 通路和 Rev1 本身的结构密切相关, 在 Rev1 的 N 端有一个 BRCT 结构域, 这个结构域在 Rev1 提高细胞抗性和增加突变率方面起很重要的作用^[90-92]。在哺乳动物细胞中, Rev1 与 PCNA 相互作用也是通过这个结构域完成的^[93]。然而, 在酵母中有两种不同的观点, 一种认为是与哺乳动物细胞中一样通过 BRCT 结构域介导的^[92-93]; 另一种认为是通过 Rev1 的 PAD 结构域介导的^[94]。在 Rev1 上有两个 UBM 结构域, 其中 UBM2 主要参与 Rev1 和泛素化的 PCNA 相互作用^[95]。与 Polη 类似, Rev1 与泛素化的 PCNA 亲和性比野生型 PCNA 高 10 倍左右^[83]。由于它的 C 端的 100 个氨基酸能够结合其他 TLS 聚合酶, 如 Polη、Polι、Polκ 以及 Polζ 聚合酶中的调节亚基 Rev7^[67,69,80,96], 因此, Rev1 在聚合酶转换过程中起到框架作用^[97]。Rev1 与泛素化的 PCNA 的相互作用在 Rev1 形成聚集点 (foci) 过程中至关重要, 因为在 UV 损伤的情况下 Rev1 形成聚集点依赖于 UBM 结构域^[95]。

在细胞中 Rev1 主要通过 TLS 通路来维持基因组的稳定性, 但是它与 Polζ 共同作用会引入更多的自发突变和诱发突变。通过反义 RNA 技术降低 Rev1 的表达会减少 UV 和 BPDE 诱导的抗 6-TG 的突变体^[98-100]。并且, 对应不同的损伤类型, 如顺铂、MMS、UV 和 4-硝基喹啉-1-氧化物 (4-NQO), Rev1 的表达量不同, 细胞也表现出不同的抗性^[98-101]。对于 UV 损伤类型, Polη 具有无错修复功能, 但在 XPV 细胞中, 细胞具有 Rev1 依赖的易错 TLS 修复功能^[91]。

2.3 Polt

Polt 并不存在于原核和酵母细胞中, 在体外复制过程中有很高的易错性, 但它和 Polη 类似, 能够准确快速地跨越 CPD 损伤类型^[59,102-104]。Polt 的 N 端具有与其他 Y 家族聚合酶相似的聚合酶结构域和聚合酶活性^[78], 还有一个 PIP 结构域能够与 PCNA 相互作用^[105]。在 C 端还有两个 UBM 结构域能够提高与泛素化的 PCNA 的相互作用^[63]。Polt 在哺乳动物细胞中被定义为易错修复的 TLS 聚合酶。如果以 T 为模板, Polt 在复制过程中加入 dGMP 比加入 dAMP 的概率高 3~10 倍, 而且不同于复制性聚合酶和其他 Y 家族聚合酶, 它以嘌呤为模板比以嘧啶为模板有更高的准确性^[106-108]。并且,

Polt 能够以扭曲的 DNA 为模板或是碱基缺失的 DNA 为模板插入核苷酸, 如 6-4 光产物二聚体和碱基缺失等损伤类型^[108-109]。Polt 在插入碱基后并没有延伸功能, 所以 Polt 在行使功能时需要 Polζ 的延伸作用^[108,110]。

在 UV 损伤情况下, Polt 能够与 DNA 复制复合体共定位参与 DNA 损伤应答^[111]。在此过程中很多因素影响 Polt 的招募和调控, 如 Polt 可以与 Rev1 的 C 端相互作用, 在 UV 损伤位点 Polt 与 Rev1 共定位^[67]。Polt 也可以通过保守的 PIP 结构域与 PCNA 相互作用^[105]。与野生型 PCNA 相比, Polt 与泛素化的 PCNA 有更高的亲和性, 这源于其自身的 UBM 结构域。在 UV 损伤情况下, UBM 突变的 Polt 不能跟 PCNA 共定位。在 XPV 细胞中, 如果敲除 Polt, 细胞会有更高的 UV 诱变率, 也就是说 Polt 参与其中易错的 TLS 通路。Polt 是能够跨越氧化产物 8-oxo-dG 的多种聚合酶其中的一个, 能够增加氧化胁迫下的突变率。除了 TLS 功能之外, Polt 还参与碱基切除修复功能。

2.4 Polκ

Polκ 是 Y 家族聚合酶 DinB/Polκ 的一个分支, 在结构上从原核生物到脊椎动物比较保守^[118]。在体外实验中, Polκ 可以在不同损伤的 DNA 模板对面插入核苷酸, 包括碱基缺失、被修饰的鸟嘌呤或 BPDE、8-oxoG、乙二醇胸腺嘧啶^[119-124]。与 Polη 和 Polι 不同, Polκ 对 DNA 上体积庞大的 N²-dG 小沟有很高的适应性, 能够快速跨越这种损伤类型, 由于它自身的结构和性能可以无错地在 N²-dG 对应位置插入 dCTP^[125]。在哺乳动物细胞中, Polκ 与 Polζ 共同作用可以无错地跨越 BPDE-dG 损伤类型。相反, 这两种聚合酶共同作用在跨越顺铂产生的链内交联顺铂 -GG 损伤的时候会引入更高突变率^[75], 并且 Polκ 不能跨越 UV 产生的 CPD 二聚体和 6-4 光产物二聚体, 在体外也不能跨越由顺铂造成的 DNA 链内交联和 O⁶-MeG 损伤类型^[52]。

在结构上, Polκ 与其他聚合酶类似, 其 N 端序列对于 Polκ 的活性是必不可少的^[126]。它有两个 PIP 结构域用来结合 PCNA^[64,127], 也有经典的 Rev1 结合结构域 (560~615) 与 Rev1 的 C 端相互作用^[67,69], 其中 567 和 568 位两个苯丙氨酸在 Polκ 与 Rev1 相互作用中是必不可少的。在 *Polκ*^{-/-} 小鼠成纤维细胞中表达 Polκ 苯丙氨酸突变体, 细胞就不能跨越 BPDE 和 UV 损伤, 突变的 Polκ 也不能和 Rev1 共定位^[128]。在 Polκ 的 C 端也有经典的 UBM 结构域^[63],

这个与 Ub 结合的结构域在 Polk 与泛素化的 PCNA 结合时候起很重要的作用,与没有被泛素化修饰的 PCNA 相比,Polk 与泛素化的 PCNA 相互作用强很多^[6,129]。

2.5 Polζ

Polζ 是 TLS 聚合酶中唯一一个已知的 B 家族 TLS 聚合酶,由催化亚基 Rev3 和调节亚基 Rev7 组成^[130]。作为 TLS 聚合酶,Polζ 能够参与多种跨损伤合成,如 UV 损伤产生的 T<gtT 二聚体、BPDE 等^[131-133]。但是,Polζ 更重要的功能是起延伸作用,它需要 Y 家族聚合酶在特定的损伤位点插入适应的碱基,然后经过聚合酶的转换,Polζ 继续使 DNA 复制延伸^[108]。Polζ 类似 Y 家族聚合酶,它不具有 3'→5' 的外切酶活性,所以在延伸时候会有更高的突变率,于是 Polζ 被认为主要参与易错的 TLS。UV 损伤会产生更高的诱发突变率,这主要依赖于 Polζ,在酵母细胞和人类细胞中,敲除或下调 Rev3 都能大大降低 UV 损伤产生的诱发突变^[85,130]。所以,Polζ 参与的易错 TLS 主要有两步,第一步是特定聚合酶加入 1~2 个核苷酸;第二步是 Polζ 的易错延伸功能。在这一过程中,两种 TLS 聚合酶之间的转换起很重要的作用^[108,110]。

Polζ 聚合酶由两个亚基组成,其中催化亚基 Rev3 是一个相对较大的蛋白质,在酵母中 Rev3 有 1 504 个氨基酸残基,而人类细胞中的 Rev3 有 3 103 个氨基酸残基^[134]。由于 Rev3 蛋白如此之大,在细胞中表达全长不是很容易,并且 Rev3 在酵母中可以敲除但是人类细胞并不能敲除,可能与 Rev3 参与其他必要的功能有关,如参与与细胞不稳定性有关的普通脆性位点(CFS)^[135]。由于各种局限性,目前对于 Rev3 结构了解比较少。Rev3 上有一个 Rev7 结合结构域和一个聚合酶结构域^[132,136-138]。Rev3 可以通过 Rev7 二聚体介导与 Rev1 的相互作用,并且 Rev3 的 TLS 功能完全依赖于 Rev1^[139]。这种完全依赖性说明 Rev3 与 Rev1 在 TLS 功能上处于同一通路,Rev3 的延伸作用依赖 Rev1 的框架功能,也许 Rev1 介导 TLS 聚合酶之间的转化。由于 Rev1 的功能受到泛素化的 PCNA 调节,所以,Rev3 的功能也同样受到泛素化的 PCNA 调节,并且 UV 损伤情况下 Rev3 与 PCNA 共定位^[139]。

3 PCNA多泛素化修饰在无错耐受通路中的作用

无错耐受通路被认为是以无损伤的姐妹染色单

体为模板进行 DNA 合成,这种 DNA 合成方式不像 TLS 通路那样引入很高的突变,因此,称为无错耐受通路^[140]。虽然这种耐受方式从分子机制探究的还不是很清楚,但是在酵母中从遗传学角度证明了 PCNA 多泛素化修饰在这条通路中起很重要的作用,需要 MMS2、UBC13 和 RAD5^[33,141-142]。在酵母中,这条通路能参与较低剂量的 UV 损伤的耐受^[143]。Rad5 是一个多功能蛋白,它的 ATP 酶活性和 RING 结构域参与 UV 损伤修复,ATP 酶活性和 RING 结构域突变体都能增强细胞对 UV 的敏感性^[144-145]。Rad5 不仅可以与 Rad18 和 Ubc13 相互作用,还能跟 PCNA 相互作用,这些相互作用有助于招募 Ubc13-Mms2 复合物,然后进一步在损伤位点处与 Rad6-Rad18 复合物相互作用^[31,142]。在酵母中敲除 MMS、UBC13 或 RAD5 都会使 PCNA 多泛素化条带消失^[31],细胞也没有无错的复制后修复功能^[33,35,141,146],但是这并不影响 PCNA 的单泛素化水平,可能原因是 Ubc13-Mms2 替代 Rad6-Rad18 复合物来介导单泛素化的 PCNA 继续被 K63 链连接的多泛素化修饰,所以 PCNA 被 K63 链连接的多泛素化修饰参与无错耐受通路。

在哺乳动物细胞中经过 UV 处理也能检测到 PCNA 的多泛素修饰,与在酵母中类似,哺乳动物中的多泛素化修饰也是 K63 连接的多泛素链,这种修饰能够保护细胞免于产生更多的突变。在哺乳动物细胞中有两个 Rad5 的同源蛋白被发现,SHPR1 和 HLTF^[147-150],可能参与哺乳动物细胞中 PCNA 的 K63 链连接的多泛素化修饰,但是在各种损伤的情况下,比如 UV、HU、MMS 等处理细胞,在细胞内源水平上都很难观察到 PCNA 的多泛素化。因此,在哺乳动物细胞中,PCNA 多泛素修饰是不是普遍存在以及如何参与 DNA 损伤耐受机制还有待进一步研究。

4 展望与讨论

在 DNA 损伤情况下,PCNA 能够在 Rad6-Rad18 复合物作用下被单泛素化修饰,这种修饰在 DNA 跨损伤合成过程中起非常重要的作用,通过增强与 Y 家族聚合酶的亲和性,促进 TLS 聚合酶与复制性聚合酶之间的转化,利用这些 TLS 聚合酶跨越损伤位点,使 DNA 复制继续进行,这也是被普遍认可的观点。但是,PCNA 单泛素化修饰参与跨损伤合成机制中仍然有很多地方不是很清楚。第一,在 DNA 损伤情况下 PCNA 会被单泛素化修饰,通过

增加物理亲和性来招募各种 TLS 聚合酶到损伤位点参与跨损伤合成, 这种观点是否正确; PCNA 泛素化是否足以启动 TLS 通路, 还是它只是其中一个因素。第二, TLS 通路中, 各种聚合酶都有自己的特点和特性, 对于不同的损伤类型不同的聚合酶有不同的合成效率和准确率, 如 Pol η 高效准确地跨越 UV 损伤产生的胸腺嘧啶二聚体, 对于同一种损伤类型有多种不同种类的 TLS 聚合酶参与, 如 UV 损伤, Pol η 、Pol ι 、Pol κ 、Rev1、Rev3 都能与 PCNA 共定位, 这些聚合酶如何参与不同损伤的具体机制, 各种聚合酶之间的相互协作方式也不是很清楚; 还有各种聚合酶的各种结构域与功能也有待我们进一步具体探知, 尤其是 Rev3, 如此之大的一个蛋白质已知的结构域却很少。第三, TLS 聚合酶参与 DNA 跨损伤合成都是由泛素化的 PCNA 调节的, 然而泛素化的 PCNA 是如何选择区分不同的 TLS 聚合酶的, 在损伤修复时是如何调控不同聚合酶之间转换的等等, 很多问题都不是很清楚; 而且, 研究 PCNA 单泛素化受到很多局限性, PCNA 单泛素化的水平与内源 PCNA 相比要低很多, 并且泛素化的 PCNA 并不是很稳定, 容易被去泛素化酶 Usp1 水解, 无法得到大量稳定的单泛素化的 PCNA, 因此, 在 PCNA 泛素化修饰参与跨损伤修复合成几乎遇到了瓶颈。为了克服各种限制, 人们一直致力于 PCNA 泛素化在跨损伤修复合成中的研究, 在酵母中利用 PCNA 和泛素的融合蛋白来模拟泛素化的 PCNA, 从结构和功能上分析了这种融合模拟泛素化的 PCNA 的可行性并取得了一定成果^[81,151-152]。这一方法被进一步扩展应用到哺乳动物细胞中, 研究发现 PCNA 和泛素的融合蛋白可以替代内源泛素化的 PCNA, 在 DNA 损伤情况下通过 Y 家族聚合酶中的 Rev1 为细胞提供抗性, 并且这种融合蛋白能够像内源泛素化的 PCNA 一样增强对 TLS 聚合酶的亲和性^[83]。目前, PCNA 泛素化都伴随着复杂的 DNA 损伤处理, 即便这样也很难得到大量稳定的泛素化的 PCNA, 因此, 在以后 PCNA 泛素化参与跨损伤修复合成研究中, 用 PCNA 融合蛋白来模拟泛素化的 PCNA 将成为一种有力手段, 有望突破目前面临的瓶颈。

PCNA 单泛素化调节 TLS 通路, 多泛素化参与无错耐受, SUMO 化修饰通过 Srs2 抑制同源重组。PCNA 这些不同修饰介导的不同通路总结在图 1 中。PCNA 泛素化修饰不仅参与 DNA 损伤修复, 还参与细胞周期等, 因此, 在 DNA 损伤情况下, 可能

会出现一个广谱效应, 一方面抑制细胞周期, 保留足够的时间使 DNA 进行修复; 另一方面启动各种机制对损伤的 DNA 进行修复^[153]。PCNA 多泛素化参与 DNA 损伤耐受通路中的无错修复, 利用未损伤的姐妹染色体上的 DNA 为模板完成 DNA 复制过程。这一机制在酵母中研究得相对较多, 然而, 在哺乳动物细胞中已知得却很少。体外试验中已知 Ubc13-Mms2 参与 K63 链的形成, 并且两个 Rad5 的同源蛋白都参与 K63 链的形成, 但是在体内即便是在 DNA 损伤情况下依然很难看到, 所以, 在哺乳动物细胞中 PCNA 多泛素化参与的无错修复一直是个谜。近期有实验室利用化学合成的方法人工构建出连有 K63 链的 PCNA, 用于模拟 PCNA 多泛素修饰, 一些体外实验发现连有 K63 链的 PCNA 通过抑制 TLS 通路介导无错修复^[154]。本课题组通过模拟的方式, 发现在哺乳动物细胞中 PCNA 多泛素化修饰可以启动同源重组机制。因此, 在细胞中通过 PCNA 多泛素化修饰抑制 PCNA 单泛素化的功能, 启动同源重组来进行无错修复也是一种可能机制, 不过具体机理有待进一步的探究。

[参 考 文 献]

- [1] Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, et al. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, 1984, 309(5966): 374-6
- [2] Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, et al. Identification of a nuclear polypeptide ("cyclin") whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and to transformation. *Prog Clin Biol Res*, 1982, 85(Pt A): 235-48
- [3] Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol*, 1980, 84(3): 795-802
- [4] Krishna TS, Kong XP, Gary S, et al. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 1994, 79(7): 1233-43
- [5] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 2007, 129(4): 665-9
- [6] Bi X, Barkley LR, Slater DM, et al. Rad18 regulates DNA polymerase κ and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(9): 3527-40
- [7] Watanabe K, Tateishi S, Kawasuji M, et al. Rad18 guides pol η to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J*, 2004, 23(19): 3886-96
- [8] Haracska L, Unk I, Johnson RE, et al. Roles of yeast DNA polymerases δ and ζ and of Rev1 in the bypass of abasic sites. *Genes Dev*, 2001, 15(8): 945-54
- [9] Haracska L, Johnson RE, Unk I, et al. Physical and functional interactions of human DNA polymerase η with

- PCNA. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(21): 7199-206
- [10] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 425-79
- [11] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, 116(2): 181-90
- [12] Parker JL, Ulrich HD. Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5. *EMBO J*, 2009, 28(23): 3657-66
- [13] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 405-39
- [14] Peng J, Schwartz D, Elias JE, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(8): 921-6
- [15] Xu P, Peng J. Characterization of polyubiquitin chain structure by middle-down mass spectrometry. *Anal Chem*, 2008, 80(9): 3438-44
- [16] Bailly V, Lamb J, Sung P, et al. Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev*, 1994, 8(7): 811-20
- [17] Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A. The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, 1987, 329(6135): 131-4
- [18] Jones JS, Weber S, Prakash L. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD18 gene encodes a protein that contains potential zinc finger domains for nucleic acid binding and a putative nucleotide binding sequence. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(14B): 7119-31
- [19] Tateishi S, Sakuraba Y, Masuyama S, et al. Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7927-32
- [20] Notenboom V, Hibbert RG, van Rossum-Fikkert SE, et al. Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(17): 5819-30
- [21] Bailly V, Prakash S, Prakash L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(8): 4536-43
- [22] Shiomi N, Mori M, Tsuji H, et al. Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(2): e9
- [23] Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, et al. Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol Cell*, 2008, 29(5): 625-36
- [24] Niimi A, Brown S, Sabbioneda S, et al. Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(42): 16125-30
- [25] Karras GI, Jentsch S. The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell*, 2010, 141(2): 255-67
- [26] Leach CA, Michael WM. Ubiquitin/SUMO modification of PCNA promotes replication fork progression in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol*, 2005, 171(16): 947-54
- [27] Yang XH, Zou L. Dual functions of DNA replication forks in checkpoint signaling and PCNA ubiquitination. *Cell Cycle*, 2009, 8(2): 191-4
- [28] Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 195-201
- [29] Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, et al. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 339-47
- [30] Cohn MA, Kowal P, Yang K, et al. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 786-97
- [31] Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 2002, 419(6903): 135-41
- [32] Xiao W, Lin SL, Broomfield S, et al. The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(17): 3908-14
- [33] Broomfield S, Chow BL, Xiao W. MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5678-83
- [34] McKenna S, Spyropoulos L, Moraes T, et al. Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 40120-26
- [35] Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, 1999, 96(5): 645-53
- [36] Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 355-82
- [37] Melchior F. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 591-626
- [38] Su HL, Li SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene*, 2002, 296(1-2): 65-73
- [39] Matunis MJ. On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications. *Mol Cell*, 2002, 10(3): 441-2
- [40] Johnson ES, Blobel G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol*, 1999, 147(5): 981-4
- [41] Ladner JE, Pan M, Hurwitz J, et al. Crystal structures of two active proliferating cell nuclear antigens (PCNAs) encoded by *Thermococcus kodakaraensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(7): 2711-6
- [42] Amin NS, Holm C. *In vivo* analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair. *Genetics*, 1996, 144(2): 479-93
- [43] Eissenberg JC, Ayyagari R, Gomes XV, et al. Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA

- polymerase ϵ . *Mol Cell Biol*, 1997, 17(11): 6367-78
- [44] Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, et al. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 202-10
- [45] Ulrich HD, Vogel S, Davies AA. SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle*, 2005, 4(12): 1699-702
- [46] Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*, 2009, 458(7237): 461-7
- [47] Kerscher O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep*, 2007, 8(6): 550-5
- [48] Gali H, Juhasz S, Morocz M, et al. Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 6049-59
- [49] Santiago A, Godsey AC, Hossain J, et al. Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: evolutionary conservation from *Drosophila* to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle*, 2009, 8(1): 76-87
- [50] Ting L, Jun H, Junjie C. RAD18 lives a double life: its implication in DNA double-strand break repair. *DNA Repair: Amst*, 2010, 9(12): 1241-8
- [51] Xu X, Ball L, Chen W, et al. The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass via physical interaction with a Rad51 paralogue. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81371
- [52] Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 317-53
- [53] Waters LS, Minesinger BK, Wiltout ME, et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2009, 73(1): 134-54
- [54] Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RP, et al. The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell*, 2001, 8(1): 7-8
- [55] Lange SS, Takata K, Wood RD. DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 96-110
- [56] Guo C, Kosarek-Stancel JN, Tang TS, et al. Y-family DNA polymerases in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(14): 2363-81
- [57] Lehmann AR. Translesion synthesis in mammalian cells. *Exp Cell Res*, 2006, 312(14): 2673-6
- [58] Washington MT, Johnson RE, Prakash S. Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase η . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3094-9
- [59] Johnson RE, Prakash S, Prakash L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science*, 1999, 283(5404): 1001-4
- [60] Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR. Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell*, 2004, 14(4): 491-500
- [61] Acharya N, Haracska L, Prakash S. Complex formation of yeast Rev1 with DNA polymerase η . *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23): 8401-8
- [62] Lehmann AR. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett*, 2005, 579(4): 873-6
- [63] Bienko M, Green CM, Crosetto N, et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, 2005, 310(5755): 1821-4
- [64] Haracska L, Unk I, Johnson RE, et al. Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase κ by PCNA. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(3): 784-91
- [65] Acharya N, Yoon JH, Gali H, et al. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase η in translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(46): 17724-9
- [66] Haracska L, Acharya N, Unk I, et al. A single domain in human DNA polymerase ι mediates interaction with PCNA: implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 1183-90
- [67] Guo C, Fischhaber PL, Luk-Paszyc MJ, et al. Mouse Rev1 protein interacts with multiple DNA polymerases involved in translesion DNA synthesis. *EMBO J*, 2003, 22(24): 6621-30
- [68] Murakumo Y, Roth T, Ishii H, et al. A human REV7 homolog that interacts with the polymerase ζ catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 4391-7
- [69] Ohashi E, Murakumo Y, Kanjo N, et al. Interaction of hREV1 with three human Y-family DNA polymerases. *Genes Cells*, 2004, 9(6): 523-31
- [70] Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, et al. The *XPD* (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, 1999, 399(6737): 700-4
- [71] Haracska L, Yu SL, Johnson RE, et al. Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η . *Nat Genet*, 2000, 25(4): 458-61
- [72] Maga G, Villani G, Crespan E, et al. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*, 2007, 447(7144): 606-8
- [73] Lee DH, Pfeifer GP. Translesion synthesis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine by DNA polymerase η *in vivo*. *Mutat Res*, 2008, 641(1-2): 19-26
- [74] Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, et al. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η . *Biochemistry*, 2000, 39(16): 4575-80
- [75] Shachar S, Ziv O, Avkin S, et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J*, 2009, 28(4): 383-93
- [76] Bassett E, King NM, Bryant MF, et al. The role of DNA polymerase η in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6469-75
- [77] Chiapperino D, Kroth H, Kramarczuk IH, et al. Preferential misincorporation of purine nucleotides by human DNA polymerase η opposite benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine adducts. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 8401-8

- 2002, 277(14): 11765-71
- [78] Yang W. Damage repair DNA polymerases η . *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13(1): 23-30
- [79] Kannouche P, Broughton BC, Volker M, et al. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase η , defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 158-72
- [80] Tissier A, Kannouche P, Reck MP, et al. Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol η and REV1 protein. *DNA Repair: Amst*, 2004, 3(11): 1503-14
- [81] Parker JL, Bielen AB, Dikic I, et al. Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase η in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(3): 881-9
- [82] Kannouche PL, Lehmann AR. Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle*, 2004, 3(8): 1011-3
- [83] Qin Z, Lu M, Xu X, et al. DNA-damage tolerance mediated by PCNA*Ub fusions in human cells is dependent on Rev1 but not Pol η . *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(15): 7356-69
- [84] Sabbioneda S, Gourdin AM, Green CM, et al. Effect of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination and chromatin structure on the dynamic properties of the Y-family DNA polymerases. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(12): 5193-202
- [85] Lawrence CW. Cellular functions of DNA polymerase ζ and Rev1 protein. *Adv Protein Chem*, 2004, 69: 167-203
- [86] Masuda Y, Takahashi M, Fukuda S, et al. Mechanisms of dCMP transferase reactions catalyzed by mouse Rev1 protein. *J Biol Chem*, 2002, 277(4): 3040-6
- [87] Nair DT, Johnson RE, Prakash L, et al. Rev1 employs a novel mechanism of DNA synthesis using a protein template. *Science*, 2005, 309(5744): 2219-22
- [88] Lin W, Xin H, Zhang Y, et al. The human REV1 gene codes for a DNA template-dependent dCMP transferase. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(22): 4468-75
- [89] Masuda Y, Takahashi M, Tsunekuni N, et al. Deoxycytidyl transferase activity of the human REV1 protein is closely associated with the conserved polymerase domain. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15051-8
- [90] Lawrence CW. Cellular roles of DNA polymerase ζ and Rev1 protein. *DNA Repair: Amst*, 2002, 1(6): 425-35
- [91] Jansen JG, Tsaalbi-Shtylik A, Langerak P, et al. The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1): 356-65
- [92] Pustovalova Y, Maciejewski MW, Korzhnev DM. NMR mapping of PCNA interaction with translesion synthesis DNA polymerase Rev1 mediated by Rev1-BRCT domain. *J Mol Biol*, 2013, 425(17): 3091-105
- [93] Guo C, Sonoda E, Tang TS, et al. REV1 protein interacts with PCNA: significance of the REV1 BRCT domain *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell*, 2006, 23(2): 265-71
- [94] Sharma NM, Kochenova OV, Shcherbakova PV. The non-canonical protein binding site at the monomer-monomer interface of yeast proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates the Rev1-PCNA interaction and Pol ζ /Rev1-dependent translesion DNA synthesis. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33557-66
- [95] Guo C, Tang TS, Bienko M, et al. Ubiquitin-binding motifs in REV1 protein are required for its role in the tolerance of DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(23): 8892-900
- [96] Murakumo Y, Ogura Y, Ishii H, et al. Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J Biol Chem*, 2001, 276(38): 35644-51
- [97] Friedberg EC, Lehmann AR, Fuchs RP. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*, 2005, 18(5): 499-505
- [98] Mukhopadhyay S, Clark DR, Watson NB, et al. REV1 accumulates in DNA damage-induced nuclear foci in human cells and is implicated in mutagenesis by benzo [a] pyrenediolepoxide. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(19): 5820-6
- [99] Clark DR, Zacharias W, Panaitescu L, et al. Ribozyme-mediated REV1 inhibition reduces the frequency of UV-induced mutations in the human HPRT gene. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): 4981-8
- [100] Gibbs PE, Wang XD, Li Z, et al. The function of the human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* REV1 is required for mutagenesis induced by UV light. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(8): 4186-91
- [101] Poltoratsky V, Horton JK, Prasad R, et al. REV1 mediated mutagenesis in base excision repair deficient mouse fibroblast. *DNA Repair: Amst*, 2005, 4(10): 1182-8
- [102] Ishikawa T, Uematsu N, Mizukoshi T, et al. Mutagenic and nonmutagenic bypass of DNA lesions by *Drosophila* DNA polymerases dpol ζ and dpol ι . *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15155-63
- [103] Tissier A, Frank EG, McDonald JP, et al. Biochemical characterization of human DNA polymerase ι provides clues to its biological function. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2): 183-7
- [104] McDonald JP, Frank EG, Plosky BS, et al. 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase ι and have normal immunoglobulin hypermutation. *J Exp Med*, 2003, 198(4): 635-43
- [105] Vidal AE, Kannouche P, Podust VN, et al. Proliferating cell nuclear antigen-dependent coordination of the biological functions of human DNA polymerase ι . *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48360-8
- [106] Tissier A, McDonald JP, Frank EG, et al. pol ι , a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev*, 2000, 14(13): 1642-50
- [107] Zhang Y, Yuan F, Wu X, et al. Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase ι . *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19): 7099-108
- [108] Johnson RE, Washington MT, Haracska L, et al. Eukaryotic polymerases ι and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, 2000, 406(6799): 1015-9
- [109] Tissier A, Frank EG, McDonald JP, et al. Misinsertion and

- bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase ι . *EMBO J*, 2000, 19(19): 5259-66
- [110] Prakash S, Prakash L. Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev*, 2002, 16(15): 1872-83
- [111] Kannouche P, Fernandez de Henestrosa AR, Coull B, et al. Localization of DNA polymerases η and ι to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *EMBO J*, 2002, 21(22): 6246-56
- [112] Plosky BS, Vidal AE, Fernandez de Henestrosa AR, et al. Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ι and η via interactions with ubiquitin. *EMBO J*, 2006, 25(12): 2847-55
- [113] Dumstorf CA, Clark AB, Lin Q, et al. Participation of mouse DNA polymerase ι in strand-biased mutagenic bypass of UV photoproducts and suppression of skin cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18083-8
- [114] Vaisman A, Woodgate R. Unique misinsertion specificity of pol ι may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines. *EMBO J*, 2001, 20(22): 6520-9
- [115] Zhang Y, Yuan F, Wu X, et al. Response of human DNA polymerase ι to DNA lesions. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(4): 928-35
- [116] Ito A, Koshikawa N, Mochizuki S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the expression of DNA polymerase ι in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(1): 306-11
- [117] Bebenek K, Tissier A, Frank EG, et al. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase ι *in vitro*. *Science*, 2001, 291(5511): 2156-9
- [118] Gerlach VL, Aravind L, Gotway G, et al. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 11922-7
- [119] Ohashi E, Ogi T, Kusumoto R, et al. Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase κ . *Genes Dev*, 2000, 14(13): 1589-94
- [120] Gerlach VL, Feaver WJ, Fischhaber PL, et al. Purification and characterization of pol κ , a DNA polymerase encoded by the human DINB1 gene. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 92-8
- [121] Rechkoblit O, Zhang Y, Guo D, et al. trans-Lesion synthesis past bulky benzo[a]pyrene diol epoxide N2-dG and N6-dA lesions catalyzed by DNA bypass polymerases. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 30488-94
- [122] Zhang Y, Yuan F, Wu X, et al. Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase κ *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(21): 4138-46
- [123] Suzuki N, Itoh S, Poon K, et al. Translesion synthesis past estrogen-derived DNA adducts by human DNA polymerases η and κ . *Biochemistry*, 2004, 43(20): 6304-11
- [124] Fischhaber PL, Gerlach VL, Feaver WJ, et al. Human DNA polymerase κ bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis *in vitro*, preferentially incorporating correct nucleotides. *J Biol Chem*, 2002, 277(40): 37604-11
- [125] Choi JY, Angel KC, Guengerich FP. Translesion synthesis across bulky N2-alkyl guanine DNA adducts by human DNA polymerase κ . *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21062-72
- [126] Uljon SN, Johnson RE, Edwards TA, et al. Crystal structure of the catalytic core of human DNA polymerase κ . *Structure*, 2004, 12(8): 1395-404
- [127] Yoon JH, Acharya N, Park J, et al. Identification of two functional PCNA-binding domains in human DNA polymerase κ . *Genes Cells*, 2014, 19(7): 594-601
- [128] Ohashi E, Hanafusa T, Kamei K, et al. Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase κ function. *Genes Cells*, 2009, 14(2): 101-11
- [129] Guo C, Tang TS, Bienko M, et al. Requirements for the interaction of mouse Pol κ with ubiquitin and its biological significance. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4658-64
- [130] Nelson JR, Lawrence CW, Hinkle DC. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase ζ . *Science*, 1996, 272(5268): 1646-9
- [131] Gibbs PE, McGregor WG, Maher VM, et al. A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase ζ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6876-80
- [132] Neal JA, Fletcher KL, McCormick JJ, et al. The role of hRev7, the accessory subunit of hPol ζ , in translesion synthesis past DNA damage induced by benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE). *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 97
- [133] Takezawa J, Ishimi Y, Aiba N, et al. Rev1, Rev3, or Rev7 siRNA abolishes ultraviolet light-induced translesion replication in HeLa cells: a comprehensive study using alkaline sucrose density gradient sedimentation. *J Nucleic Acids*, 2010, 2010: 750296
- [134] Gan GN, Wittschieben JP, Wittschieben BO, et al. DNA polymerase ζ (pol ζ) in higher eukaryotes. *Cell Res*, 2008, 18(1): 174-83
- [135] Bhat A, Andersen PL, Qin Z, et al. Rev3, the catalytic subunit of Pol ζ , is required for maintaining fragile site stability in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(4): 2328-39
- [136] Tanaka K. [Structure and function of Mad2/Mad2L2 (Rev7)]. *Seikagaku*, 2013, 85(8): 629-37
- [137] Sharma S, Hicks JK, Chute CL, et al. REV1 and polymerase ζ facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(2): 682-91
- [138] Zhang W, Qin Z, Zhang X, et al. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Lett*, 2011, 585(18): 2786-94
- [139] Andersen PL, Xu F, Ziola B, et al. Sequential assembly of translesion DNA polymerases at UV-induced DNA damage sites. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(13): 2373-83
- [140] Broomfield S, Hryciw T, Xiao W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 2001, 486(3): 167-84
- [141] Brusky J, Zhu Y, Xiao W. UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 2000, 37(3): 168-74

- [142] Ulrich HD, Jentsch S. Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3388-97
- [143] Hishida T, Kubota Y, Carr AM, et al. RAD6-RAD18-RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature*, 2009, 457(7229): 612-5
- [144] Gangavarapu V, Haracska L, Unk I, et al. Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7783-90
- [145] Ulrich HD. Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7051-8
- [146] Xiao W, Chow BL, Fontanie T, et al. Genetic interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 1999, 435(1): 1-11
- [147] Unk I, Hajdu I, Fatyol K, et al. Human SHPRH is an ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48): 18107-12
- [148] Motegi A, Sood R, Moinova H, et al. Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol*, 2006, 175(5): 703-8
- [149] Motegi A, Liaw HJ, Lee KY, et al. Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(34): 12411-6
- [150] Unk I, Hajdu I, Fatyol K, et al. Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3768-73
- [151] Pastushok L, Hanna M, Xiao W. Constitutive fusion of ubiquitin to PCNA provides DNA damage tolerance independent of translesion polymerase activities. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15): 5047-58
- [152] Ramasubramanyan S, Coulon S, Fuchs RP, et al. Ubiquitin-PCNA fusion as a mimic for mono-ubiquitinated PCNA in *Schizosaccharomyces pombe*. *DNA Repair: Amst*, 2010, 9(7): 777-84
- [153] Zhu Q, Chang Y, Yang J, et al. Post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: a key signal integrator for DNA damage response. *Oncol Lett*, 2014, 7(5): 1363-9
- [154] Yang K, Gong P, Gokhale P, et al. Chemical protein polyubiquitination reveals the role of a noncanonical polyubiquitin chain in DNA damage tolerance. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(8): 1685-91