

РЕГУЛЯЦИЯ ДНК-ПРАЙМАЗЫ-ПОЛИМЕРАЗЫ PrimPol ЧЕЛОВЕКА

Обзор

© 2023 Е.О. Болдинова^{1,2*}, А.В. Макарова^{1,2}

¹ ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: lizaboldinova@yandex.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2022

После доработки 27.06.2023

Принята к публикации 28.06.2023

Передача генетической информации зависит от успешного завершения репликации ДНК. В геномной ДНК ежедневно образуются повреждения, которые создают препятствия для работы ДНК-полимераз и могут приводить к блокировке репликации, образованию разрывов ДНК, нарушению клеточного цикла и апоптозу. Кроме механизмов репарации ДНК, в клетке эволюционно сформировалось множество механизмов толерантности к повреждениям ДНК, одним из которых является реинициация синтеза ДНК на повреждённых участках лидирующей цепи с помощью ДНК-праймазы-полимеразы PrimPol. PrimPol человека была впервые описана в 2013 г. Свойства и функции PrimPol в последние годы активно исследуются, однако о регуляции работы PrimPol и связи нарушения функции фермента с заболеваниями известно очень мало. Настоящий обзор посвящён анализу механизмов регуляции PrimPol человека в контексте репликации ДНК. Подробно рассмотрено взаимодействие PrimPol с другими белками и предпринята попытка составления возможного пути регуляции активности PrimPol человека. В работе также затронут вопрос связи дисфункции PrimPol с заболеваниями человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: праймаза-полимераза PrimPol, реинициация синтеза ДНК, репликация, повреждения ДНК.

DOI: 10.31857/S0320972523080080, EDN: IJZUAF

ВВЕДЕНИЕ

Праймаза-полимераза PrimPol относится к суперсемейству архей-эукариотических праймаз (АЭП), широко представленных у эукариот, архей и ряда вирусов [1]. PrimPol человека является уникальным ферментом, способным синтезировать ДНК *de novo*, то есть без использования праймера [2–4]. Основной функцией PrimPol в клетке считается участие в реинициации синтеза ДНК на повреждённых участках генома, когда из-за столкновения с повреждением происходит остановка репликативной ДНК-полимеразы (ДНКП) и задерж-

ка продвижения репликативной вилки [5–7]. PrimPol эффективно включает нуклеотиды на против ряда повреждений ДНК, являясь транслезией (от англ. «translesion» — через повреждение) ДНКП [2, 4, 8–14]. PrimPol включается в работу во время репликации ДНК под действием генотоксического стресса и быстро накапливается на повреждённом участке хроматина [6, 7, 15, 16]. Было показано, что реинициация синтеза ДНК с помощью PrimPol важна для «прохождения» крупных бенз[а]пиреновых аддуктов [17], межцепочечных и внутрицепочечных сшивок ДНК [16, 18], G-кваруплексов [19]. Изучение свойств PrimPol

Принятые сокращения: ДНКП — ДНК-полимераза; оцДНК — одноцепочечная ДНК; ATR — Ataxia Telangiectasia and Rad3-related, серин/треониновая протеинкиназа; CHK1 — Checkpoint Kinase 1, чекпойнт-киназа 1; CMG — комплекс ДНК-хеликазы Cdc45–MCM–GINS; PCNA — Proliferating Cell Nuclear Antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток; PolDIP2 — Polymerase δ -Interacting Protein 2, белок 2, взаимодействующий с полимеразой δ ; RPA — Replication Protein A, репликативный белок A; USP36 — Ubiquitin-Specific-processing Protease 36; WRNIP1 — Werner helicase-Interacting Protein 1, белок 1, взаимодействующий с хеликазой Вернера.

* Адресат для корреспонденции.

является актуальным, поскольку нарушение её функций связано с развитием офтальмологических заболеваний [20–22], усилением митохондриальной токсичности противовирусных препаратов [23] и повышением устойчивости клеток к препаратам химиотерапии [16, 24]. Кроме того, уникальные свойства PrimPol делают её интересным объектом для биотехнологического применения, например, для совершенствования секвенирования древней ДНК [25, 26]. В настоящем обзоре обсуждается регуляция активности PrimPol в контексте процесса репликации и генотоксического и репликативного стресса, что является дополнением более ранних обзоров, затрагивающих эту тему [27, 28]. В работе приведены сведения обо всех известных на данный момент взаимодействиях PrimPol человека с белками-партнёрами и предпринята попытка анализа путей регуляции работы PrimPol на основе имеющихся данных. В обзоре также рассмотрен возможный вклад нарушения функций PrimPol в развитие заболеваний человека.

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ОСНОВНЫЕ УЧАСТНИКИ РЕПЛИСОМЫ

Регуляция работы PrimPol происходит в контексте процесса репликации ДНК и основных механизмов контроля за целостностью генома. Репликация ДНК происходит в фазе синтеза (S-фаза) клеточного цикла с помощью мультибелкового комплекса — реплисома. У эукариот в реплисому входят основные репликативные белки, отвечающие за расплетание дуплекса ДНК, точное копирование

и сохранение целостности ДНК: топоизомераза I, комплекс ДНК-хеликазы Cdc45—MCM—GINS (CMG), комплекс Pol α —праймаза, ДНКП Pol ϵ и Pol δ , ядерный антиген пролиферирующих клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), репликативный фактор C (Replication Factor C, RFC), репликативный белок A (Replication Protein A, RPA), вспомогательные белки AND-1 (Acidic Nucleoplasmic DNA-binding protein), CLASPIN, TIM—TIPIN (TIMELESS—TIMELESS Interacting Protein) и многие другие [29–35] (рис. 1).

Все фазы репликации в клетке строго регулируются для того, чтобы обеспечить полное и точное копирование генома один раз за клеточный цикл. Сборке активной реплисома предшествует распознавание точек начала репликации в фазе G1 клеточного цикла комплексом ORC (Origin Recognition Complex) [36], который затем вместе с белками-загрузчиками служит платформой для связывания репликативной хеликазы MCM (MiniChromosome Maintenance) [37]. Вначале хеликаза MCM образует неактивный двойной комплекс вокруг обеих цепей ДНК — так называемый пререпликативный комплекс, остающийся неактивным до конца фазы G1. Активация хеликазы происходит при вступлении клетки в S-фазу за счёт взаимодействия MCM с белками комплекса GINS (сокращение от *go-ichi-ni-san* — названий субъединиц белков Sld5, Psf1, Psf2, Psf3) и Cdc45 (Cell Division Cycle 45) с образованием активных комплексов CMG (Cdc45—MCM2–7—GINS) — хеликаз [38], располагающихся на комплементарных цепях ДНК [39]. Активированные CMG-хеликазы начинают двигаться вдоль лидирующих цепей ДНК

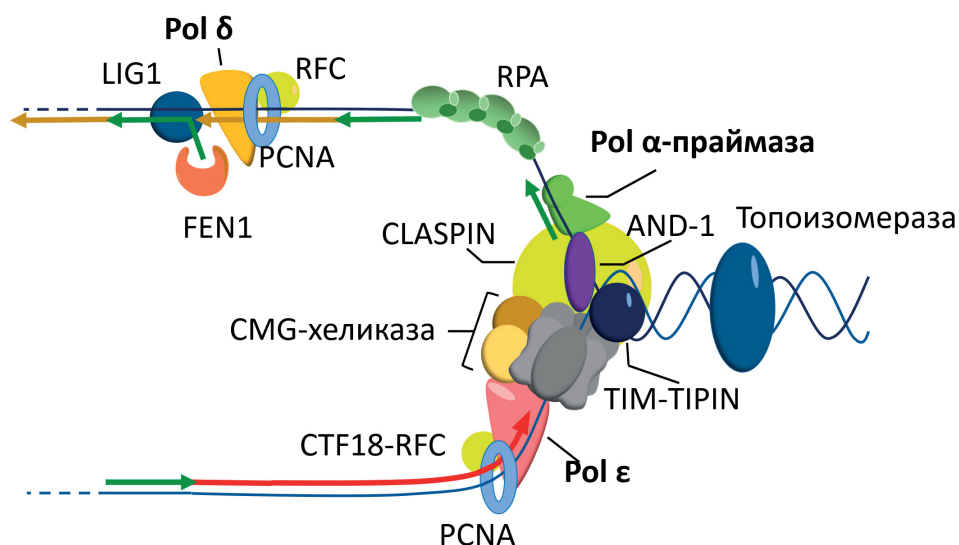


Рис. 1. Основные белки реплисома эукариот. Матричная ДНК обозначена голубыми и тёмно-синими линиями, РНК-ДНК-праймеры — зелёными линиями, вновь синтезированная ДНК — красными и жёлтыми линиями

в противоположных направлениях от точки начала репликации, оставляя участки одноцепочечной ДНК (оцДНК), на которых происходит сборка оставшихся компонентов реплисомы. С оцДНК связывается белок RPA — гетеротример, состоящий из трёх субъединиц, RPA70, RPA32 и RPA14, несущих ДНК-связывающие ОВ-домены (oligosaccharide/oligonucleotide binding domain) [40, 41]. ОВ-Домены субъединиц RPA обладают разным сродством к ДНК и, в зависимости от длины доступной к связыванию оцДНК, могут образовывать комплексы с разной конформацией, динамично переходящие один в другой. Наиболее компактный комплекс RPA с оцДНК, имеющий «глобулярную» конформацию, связывает ДНК длиной 8–10 нуклеотидов, при этом в связывании участвует только субъединица RPA70. На более протяжённых участках оцДНК RPA образует более «растянутый» комплекс, экранирующий участок ДНК длиной 30 нуклеотидов, а в связывании принимают участие ОВ-домены RPA70 и RPA32. Субъединица RPA14 непосредственно в связывании ДНК не участвует, однако она необходима для поддержания «полярности» расположения субъединиц RPA на ДНК (подробный обзор механизмов связывания SSB-белков с ДНК в работе Pestryakov et al. [42]). Молекулы RPA защищают оцДНК от действия эндонуклеаз и предотвращают гибридизацию цепей ДНК и формирование нежелательных вторичных структур. Также RPA образует контакты с белками, участвующими в репликации, репарации и ответе клеток на повреждение ДНК (обзоры Bhat et al. и Zou et al. [43, 44]).

Непосредственно копирование генома в реплисоте выполняют высокоточные репликативные ДНКП Pol δ и Pol ϵ , относящиеся к В-семейству. Pol ϵ и Pol δ осуществляют основной синтез ДНК. Эти ферменты обладают высокой процессивностью, точностью и корректирующей 3'→5'-экзонуклеазной активностью, но неспособны эффективно самостоятельно инициировать синтез ДНК [45]. Репликация ДНК начинается с синтеза коротких РНК-ДНК-праймеров четырёхсубъединичным комплексом Pol α -праймазы. Праймаза синтезирует короткий (9 нуклеотидов) РНК-праймер, а затем субстрат передаётся ДНКП Pol α , которая удлиняет его до 35 нуклеотидов [46]. Образовавшийся РНК-ДНК-гибрид может быть далее использован репликативными ДНКП. Поскольку все ДНКП осуществляют синтез ДНК с присоединением нуклеотидов к 3'-концу праймера, то на одной цепи синтез идёт непрерывно (лидирующая цепь), а на

другой (отстающая цепь) по мере расплетания ДНК происходит синтез новых праймеров Pol α -праймазой и их удлинение Pol δ с образованием фрагментов Оказаки. На лидирующей цепи синтез ДНК осуществляет Pol ϵ , образуя тесные контакты с CMG-хеликазой. Два белка двигаются по ДНК координированно [47]. Pol δ в основном синтезирует ДНК на отстающей цепи, однако может участвовать и в удвоении лидирующей цепи (до 20% синтеза лидирующей цепи), в том числе в условиях репликативного стресса [48–51].

Прерывистый характер синтеза ДНК на отстающей цепи создаёт необходимость соединения фрагментов Оказаки в единую цепь и удаления РНК-праймеров (обзор Sun et al. [52]). ДНКП Pol δ в процессе удлинения праймера, созданного Pol α -праймазой, встречает предыдущий фрагмент Оказаки и благодаря активности по вытеснению цепи некоторое время продолжает синтез ДНК, вытесняя из дуплекса 5'-РНК-участок фрагмента Оказаки. В результате образуется выступающий «лоскут», флэп-фрагмент РНК-ДНК (обзор Stodola et al. [53]), который удаляется флэп-эндонуклеазой FEN1 (Flap structure-specific EndoNuclease 1) [54, 55]. Затем два фрагмента ДНК соединяются ДНК-лигазой LIG 1 [56, 57].

Значительную роль в регуляции связывания ДНК и активности ДНКП в процессе репликации играет белок-«зажим» PCNA (обзор Gonzalez-Magana et al. [58]). PCNA — гомотримерный белок, образующий кольцо вокруг ДНК с помощью белков-«загрузчиков» RFC и STF18–RFC [59, 60]. PCNA стимулирует процессивный синтез Pol ϵ и Pol δ [60, 61], а также играет роль каркаса, на котором собираются белки, участвующие в созревании фрагментов Оказаки [57, 62, 63]. Различные посттрансляционные модификации PCNA запускают механизмы толерантности клеток к повреждениям ДНК в условиях генотоксического стресса (обзор Gonzalez-Magana et al. [58]).

В репликации ДНК участвует множество вспомогательных белковых факторов, регулирующих скорость движения репликативной вилки и работу отдельных компонентов реплисомы. Среди них важное значение имеют белки AND-1, CLASPIN и комплекс TIMELESS–TIPIN [60]. Все три белка тесно взаимодействуют с CMG-хеликазой, образуя комплекс продвижения реплисомы (replisome progression complex, RPC) [29, 30]. Самый важный из них, CLASPIN, является интегральным компонентом RPC-комплекса, и его удаление приводит к значительному замедлению репликативной вилки, однако точный механизм

его действия ещё неизвестен [60, 64]. Кроме того, CLASPIN нужен для привлечения к реплисому регуляторных протеинкиназ, участвующих в инициации репликации и ответе клетки на повреждение ДНК [65].

РЕГУЛЯЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ В УСЛОВИЯХ РЕПЛИКАТИВНОГО СТРЕССА

Регуляция клеточного цикла происходит под контролем циклин-зависимых киназ (CDK, cyclin-dependent kinases), белков-активаторов CDK — циклинов, и ингибиторов CDK. Эти сериновые/треониновые протеинкиназы фосфорилируют ключевые белки, стимулирующие переход к репликации и митозу при условии того, что клетка успешно прошла точки контроля — «чекпойнты» на границах фаз. Подробное рассмотрение клеточного цикла и его регуляции CDK-киназами представлено в обзорах Bertoli et al., Hume et al. и Malumbres et al. [66–68]. Одна из задач клетки при прохождении чекпойнта — убедиться в целостности генома. Различные повреждения ДНК активируют общие сигнальные пути, цель которых — удержать CDK-киназы в неактивном состоянии до тех пор, пока повреждение не будет устранено [69]. В ответ на повреждение ДНК может происходить задержка перехода к S-фазе (G1/S-чекпойнт), замедление процесса репликации (чекпойнты S-фазы) и запрет перехода к митозу (G2/M-чекпойнт). Чекпойнт-индуцированные сигнальные пути можно разделить на механизмы, зависящие от киназы CHK1 (CHeckpoint Kinase 1), и механизмы, находящиеся под контролем транскрипционного фактора p53. Оба типа сигнальных путей имеют некоторые общие этапы и участников, но действуют в разные периоды клеточного цикла: p53-зависимые пути работают преимущественно в G1-фазе цикла, а CHK1-киназа наиболее активна в S- и G2-фазах. С подробным разбором сигнальных путей, индуцированных повреждениями ДНК, можно ознакомиться в обзорах Williams et al., Barnum et al. и Patil et al. [70–72].

Повреждения ДНК, с которыми реплисома сталкивается в процессе репликации, зачастую вызывают остановку репликативных ДНКП и их рассинхронизацию с CMG-хеликазой, которая продолжает движение по ДНК [73–75]. Образующиеся в результате рассинхронизации реплисома длинные участки оцДНК, с которыми связан белок RPA, служат сигналом повреждения ДНК, который воспринимается молекулами-сенсорами [76]. Одними из основ-

ных сенсорных белков, регулирующих клеточный ответ на генотоксический стресс, являются протеинкиназы ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) и DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) [77]. В данном обзоре мы сосредоточим своё внимание на ATR, поскольку далее она будет фигурировать в регуляции PrimPol. В физиологических условиях ATR находится в неактивном состоянии. Активация и привлечение ATR к ДНК происходят за счёт взаимодействия с RPA, белками-активаторами ATRIP (ATR-Interacting Protein), TOPBP1 (TOPoisomerase II Binding Protein), ETAA1 (Ewing Tumour-Associated Antigen 1) и белками-медиаторами (CLASPIN), которые, в свою очередь, привлекаются к ДНК комплексом 9-1-1 (RAD9–HUS1–RAD1) — альтернативным белком-«зажимом» (см. обзор Saldivar et al. [78]). Система регуляции ATR реагирует на различные типы генотоксического стресса, включая повреждения ДНК, вызванные УФ-излучением, алкилирующими агентами, веществами, образующими сшивки ДНК, и блоки репликации, вызванные ингибиторами ДНКП и топоизомераз, а также снижением концентрации dNTP [79].

В зависимости от типа повреждения ДНК ATR фосфорилирует различные белки, что, в свою очередь, приводит к инициации разных путей толерантности к повреждениям ДНК: к аресту репликации (фосфорилирование CHK1-киназы), стимулированию или ингибированию реверсии репликативной вилки (фосфорилирование SMARCA1 (SWI/SNF-related, Matrix associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, subfamily A-like 1)), запуску гомологичной рекомбинации (фосфорилирование RPA, PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2), XRCC3 (X-ray repair cross complementing group 3)) или активации транслезионного синтеза (фосфорилирование REV1 и транслезионных ДНКП) [78]. Все перечисленные выше механизмы достаточно хорошо описаны [80–83]. Обнаружение PrimPol позволило выделить ещё один механизм толерантности к повреждениям ДНК — реинициацию репликации за счёт синтеза ДНК-праймеров *de novo* после остановки реплисома. Однако о регуляции данного механизма ещё почти ничего не известно.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РОЛЬ PrimPol В КЛЕТКЕ

В 2005 г. L.M. Iyer et al. в ходе биоинформатического анализа обнаружили у человека новый белок, относящийся к суперсемейству

археозукариотических праймаз, первоначально названный Eukprim2 [1]. В 2013 г. появились первые результаты исследования нового белка, показавшие, что фермент является одновременно ДНК-праймазой и ДНКП, что дало основания переименовать фермент в PrimPol (Primase/Polymerase) [2–4].

Праймаза-полимераза PrimPol человека кодируется геном *PRIMPOL*, расположенным на 4 хромосоме в локусе 4q35.1 [1]. PrimPol представляет собой белок с молекулярной массой 65 кДа, состоящий из 560 аминокислотных остатков [3]. N-Концевой каталитический домен содержит консервативные аминокислотные мотивы I, II и III, несущие остатки, необходимые для ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активностей [1, 2, 4, 9, 84, 85]. C-Концевой домен PrimPol содержит консервативный мотив цинкового пальца (ZnF) C-H-C-C (Cys419, His426, Cys446, Cys451), аналогичный праймазному домену UL52 вирусов герпеса и координирующий ионы Zn^{2+} [2, 4, 9, 86]. В C-концевом домене располагается также участок связывания с RPA (RPA-binding domain, RBD) [3, 15].

В клетках человека PrimPol распределена между цитозолем (47%), ядром (19%) и матриксом митохондрий (34%) [2]. Пик экспрессии мРНК PrimPol приходится на фазы G1–S

клеточного цикла, но количество белка в разных фазах цикла остаётся постоянным [86].

PrimPol обладает праймазной активностью, которая стимулируется ионами Mn^{2+} . В отличие от эукариотических праймаз, PrimPol человека синтезирует *de novo* как РНК, так и ДНК-праймеры. При этом эффективность синтеза ДНК-праймеров *in vitro* значительно выше, чем эффективность синтеза РНК-праймеров [4–6]. Тем не менее в качестве инициаторного нуклеотида при синтезе нуклеиновых кислот *de novo* PrimPol преимущественно использует рибонуклеотид трифосфат – АТФ. Эффективность образования динуклеотида с АТФ в 2 раза выше, чем с dATP [87]. PrimPol обладает способностью к дискриминации NTP, включая рибонуклеотиды в 11–150 раз менее эффективно, чем дезоксирибонуклеотиды [24, 88]. Однако, учитывая, что в клетке концентрация NTP существенно превышает концентрацию dNTP [89, 90], можно предположить, что *in vivo* при синтезе ДНК-праймеров PrimPol включает NTP чаще. Механизм праймазной активности PrimPol обсуждается в обзоре Blanco et al. [91].

Основной функцией PrimPol считается реинициация синтеза ДНК и возобновление движения репликативной вилки в случае остановки

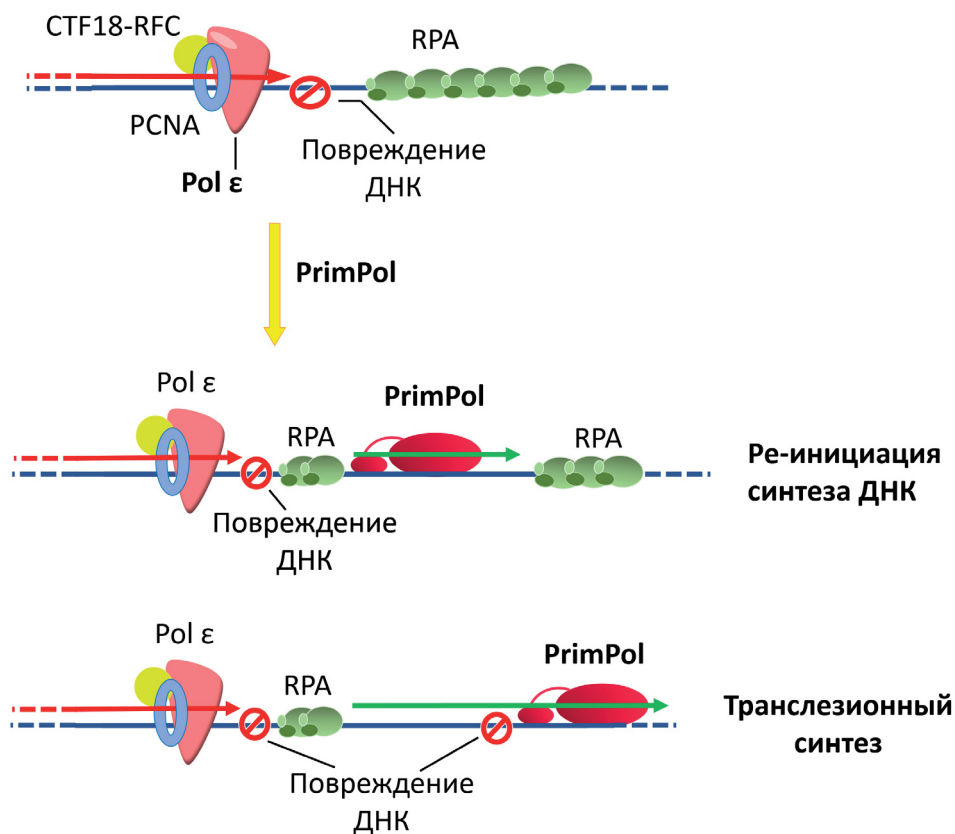


Рис. 2. Функции PrimPol в репликации повреждённой ДНК. Матричная ДНК обозначена тёмно-синей линией, праймеры – зелёной линией, основной синтез ДНК – красной линией, повреждение ДНК – красный перечёркнутый круг

реплисомы на повреждённом участке ДНК или на участке, содержащем вторичные структуры [5, 17–19, 92] (рис. 2). ДНК-праймеры, которые синтезирует PrimPol на повреждённых участках ДНК, не требуют удаления и могут быть использованы репликативными ДНКП для продолжения синтеза [2–4]. Кроме того, PrimPol эффективно включает нуклеотиды напротив ряда распространённых повреждений ДНК, таких как 8-оксогуанин (8-охо-G) [2, 4, 8, 10, 11], *O*⁶-метилгуанин (*O*⁶-me-G), 5-формилурацил (5-foU) [8], *N*²-этилгуанин (*N*²-Et-G) [14] и внутрицепочечная цисплатиновая сшивка [13] (рис. 2). Также PrimPol способна проходить апуриновые/апириимидиновые сайты (АП-сайты) и (6-4)-тиминовые димеры посредством механизма «проскакивания» повреждений ДНК [2, 8, 12, 86]. Помимо ДНК-праймазной и ДНК-полимеразной активностей, у PrimPol были описаны терминальная трансферазная [9, 12] и обратная транскриптазная активности [26], а также способность к вытеснению цепи ДНК [93].

Исследования на культуре клеток человека показали, что PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности генома. Подавление экспрессии гена *PRIMPOL* в условиях отсутствия генотоксического стресса приводит к снижению скорости пролиферации клеток по сравнению с диким типом [7, 86], снижению количества и скорости движения репликативных вилок [3, 4, 7, 9], нарушению клеточного цикла [4–7], нарушениям репликации митохондриальной ДНК [2, 12], накоплению хромосомных aberrаций и образованию микроядер [4, 7, 86].

Подавление функции PrimPol приводит к ещё более серьёзным последствиям в клетках, подвергшихся действию ДНК-повреждающих агентов. Клетки человека, нокаутные по гену *PRIMPOL*, проявляют повышенную чувствительность и геномную нестабильность по сравнению с клетками дикого типа при действии ДНК-повреждающих агентов: УФ-излучения [4–7, 86, 94], гидроксимочевина [3, 24, 86], цисплатина [5, 7, 16], метилметансульфоната [5], бензопирена [17]. Однако дисфункция PrimPol не является летальной у мышей [2], что объясняется компенсацией нарушения функции PrimPol другими механизмами толерантности к повреждениям ДНК и репарации.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ PrimPol

PrimPol накапливается в ядре в повреждённых участках ДНК и местах остановки репли-

кативной вилки *in vivo* [3, 4, 86]. Активность PrimPol и её доступ к ДНК должны строго регулироваться, чтобы вовремя обеспечить реплисому новыми праймерами при остановке репликации, но не допустить излишнего синтеза праймеров и образования одноцепочечных брешей в ДНК.

Регуляция активности PrimPol, как и других белков, участвующих в ответе клетки на повреждение ДНК, происходит с помощью фосфорилирования сериновой/треониновой протеинкиназой CHK1. CHK1 напрямую фосфорилирует остаток Ser255 PrimPol *in vitro* и в культуре клеток человека, стимулируя синтез праймеров PrimPol. Остаток Ser255 располагается в неструктурированной петле PrimPol, которая в отсутствие фосфорилирования ингибирует праймазную активность PrimPol. Фосфорилирование CHK1 происходит независимо от того, какой тип репликативного стресса испытывает клетка [95].

За негативную регуляцию PrimPol отвечает другая протеинкиназа — PLK1 (Polo-like kinase 1), которая фосфорилирует консервативный остаток PrimPol Ser538, располагающийся в С-концевой области между двумя мотивами связывания белка RPA. Предполагается, что фосфорилирование Ser538 приводит к снижению эффективности взаимодействия PrimPol с RPA; однако напрямую этого показано не было, и механизм ингибирования ещё неизвестен. Фосфорилирование протеинкиназой PLK1 происходит в конце S-фазы, что приводит к снижению эффективности привлечения PrimPol к ДНК после S-фазы. В условиях репликативного стресса наблюдается запаздывание или полное отсутствие PLK1-зависимого фосфорилирования PrimPol, что позволяет сохранить PrimPol в активном состоянии и даёт клетке время на устранение блоков репликации [96].

Убиквитинирование и деубиквитинирование белков регулирует процесс их деградации протеасомой, что позволяет регулировать количество молекул белка в клетке [97]. Одним из белков, предположительно контролирующего количество PrimPol, является деубиквитиназа USP36 (Ubiquitin-Specific-processing Protease 36), которая специфично удаляет полиубиквитиновые метки с PrimPol в позиции Lys29. PrimPol и USP36 колокализуются в области репликативных вилок в ответ на обработку клеток гидроксимочевинной. Взаимодействие PrimPol с USP36 также показано с помощью иммунопреципитации. Сверхэкспрессия USP36 в клетках приводит к повышению стабильности и количества молекул PrimPol, а подавление

экспрессии USP36 — к сокращению времени жизни PrimPol в клетке [98]. Предполагается, что при возникновении блока репликации происходит активация USP36 и привлечение PrimPol и USP36 к повреждённому участку ДНК. Деубиквитинирование стимулирует активность PrimPol и позволяет ей включиться в работу по восстановлению движения репликативной вилки [98].

Другой белок — белок 1, взаимодействующий с хеликазой Вернера (Werner helicase-Interacting Protein 1, WRNIP1) — вероятно, принимает участие в обратном процессе — деградации PrimPol с помощью протеасомы. WRNIP1 — это многофункциональный репликативный фактор, взаимодействующий с PCNA, RAD18 и Pol δ , и, предположительно, играющий роль в переключении ДНКП в процессе транслезионного синтеза [99]. В структуре WRNIP1 присутствует убиквитин-связывающий домен цинкового пальца (ubiquitin-binding zinc-finger domain, UBZ), позволяющий взаимодействовать с убиквитинированным PCNA и, вероятно, PrimPol. Показано, что при сверхэкспрессии гена *WRNIP1* в культуре клеток человека HEK293 усиливается протеасомная деградация PrimPol, которая подавляется ингибиторами протеасомы. В клетках, нокаутных по гену *WRNIP1*, количество молекул PrimPol, наоборот, повышается. Оба белка колокализируются в области репликативных вилок, а их взаимодействие подтверждается экспериментами по коиммунопреципитации [99]. Предполагается, что взаимодействие убиквитинированной PrimPol с WRNIP1 повышает доступность фермента для протеасомы.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ PrimPol БЕЛКАМИ-ПАРТНЁРАМИ

В регуляции активности ДНКП в клетке, в том числе доступе ДНКП к репликативной вилке, принимают участие многие регуляторные белковые факторы. Основным белком-партнёром, регулирующим работу ДНКП при репликации и транслезионном синтезе, является PCNA. Столкновение репликативной вилки с повреждением ДНК инициирует реакцию моноубиквитинирования PCNA, которая стимулирует процесс переключения ДНКП и сборку транслесомы. Однако PrimPol не взаимодействует напрямую с PCNA, что говорит об отличии механизма регуляции работы PrimPol от такового для ДНКП [100].

Ключевую роль в регуляции PrimPol играют белки, связывающиеся с оцДНК: ядерный

белок RPA и митохондриальный белок SSB (mtSSB, mitochondrial single strand binding protein). При столкновении репликативной вилки с повреждением происходит диссоциация комплекса ДНКП с хеликазой с образованием протяжённого участка оцДНК, покрытого RPA [73–75].

Методом масс-спектрометрии было показано, что PrimPol совыделяется из клеток человека вместе с RPA и mtSSB [3]. Взаимодействие PrimPol с RPA было продемонстрировано и в экспериментах по коиммунопреципитации [3, 15]. PrimPol взаимодействует с субъединицей RPA70 [15]. RPA играет важную роль в привлечении PrimPol к сайтам повреждений геномной ДНК после облучения клеток УФ-светом. Делеция С-концевого участка PrimPol, содержащего мотивы RBM-A и RBM-B (RPA Binding Motif), отвечающие за связывание RPA, препятствует миграции PrimPol к повреждениям ДНК *in vivo* и повышает чувствительность к ДНК-повреждающим агентам [3, 15]. Кроме того, RPA стимулирует ДНК-полимеразную, ДНК-праймазную активности PrimPol и активность по вытеснению цепи *in vitro* [15, 93, 101]. Также RPA стимулирует транслезионную активность PrimPol напротив повреждений ДНК, таких как, например, N^2 -Et-G [14].

Стимуляция PrimPol наблюдается только при низких концентрациях RPA (не насыщающих ДНК-матрицу или эквимоларных ей) на коротких (50–55 нуклеотидов) и длинных (оцДНК фага M13) ДНК-субстратах [14, 93, 101], а избыток RPA над ДНК-матрицей ингибирует активность PrimPol на всех типах ДНК-субстратов [10, 15, 100, 101]. Вероятно, при высокой концентрации RPA полностью экранирует ДНК, лишая PrimPol места посадки. Интересно отметить, что при молярном избытке по отношению к ДНК RPA образует преимущественно «короткие» комплексы с ДНК, связывающие участки длиной 8–10 нуклеотидов при участии только высокоаффинной субъединицы RPA70. Меньшая концентрация RPA и большая длина ДНК-субстрата позволяет RPA образовать «вытянутый» комплекс на участке ДНК длиной 30 нуклеотидов при участии RPA70 и RPA32 [42], что, возможно, благоприятствует образованию контактов с PrimPol.

Было показано, что делеция отрицательно заряженного С-концевого RBM нарушает стимуляцию активности PrimPol белком RPA, но это в значительной степени стимулирует ДНК-полимеразную активность и связывание PrimPol с ДНК в отсутствие RPA [102]. Полученные результаты позволили предположить,

что фермент PrimPol сам по себе находится в «выключенном» состоянии и становится полностью функциональным при взаимодействии с RPA. Возможный механизм активации PrimPol с помощью RPA предположительно включает повышение сродства PrimPol к ДНК за счёт структурной перестройки С-концевого домена. В частности, RPA может препятствовать блокировке взаимодействия PrimPol с матричной ДНК или 5'-концевым трифосфатом, опосредованной С-концевым доменом. Нейтрализация отрицательного заряда RBM при взаимодействии с RPA также может вносить вклад в повышение сродства PrimPol к ДНК.

Наряду с SSB-белками в качестве белка-партнёра PrimPol был определён белок PolDIP2 (Polymerase δ -Interacting Protein 2). PolDIP2 — это многофункциональный белок, участвующий во множестве клеточных процессов, в том числе организации веретена деления и сегрегации хромосом, процессинге премоРНК, клеточной миграции и адгезии, а также регуляции активности ДНКП (подробно изложено в обзоре Gagarinskaya et al. [103]). PolDIP2 стимулирует активность Pol δ *in vitro*, а также увеличивает процессивность и точность транслезионного синтеза Pol λ и Pol η [104, 105].

Взаимодействие PrimPol и PolDIP2 было подтверждено методом масс-спектрометрии и образованием «сшивок» между белками [106]. Показано, что PolDIP2 связывается с каталитическим доменом PrimPol в области субдомена ModN и в области неструктуриро-

ванной петли между субдоменами ModN и ModC [107]. Взаимодействие с PolDIP2 повышает сродство PrimPol к ДНК и dNTP, а также стабилизирует связывание PrimPol с 3'-концом праймера [106, 107]. В результате этого повышается процессивность и эффективность синтеза ДНК PrimPol [14, 93, 106, 107]. Взаимодействие PrimPol с PolDIP2 повышает эффективность и точность включения нуклеотидов PrimPol напротив 8-охо-G [106] и стимулирует включение нуклеотидов PrimPol напротив внутрицепочечной цисплатиновой сшивки [13] и повреждения N^2 -Et-G [14]. Похожий эффект наблюдается у Pol λ и Pol η в присутствии PCNA, RPA и PolDIP2 [104]. Однако PolDIP2 не оказывает влияния на транслезионную активность PrimPol на ДНК с циклобутановыми пиримидиновыми димерами (ЦПД), АП-сайтами и объёмными N^2 -аддуктами гуанина [14, 106].

Важно отметить, что подавление экспрессии гена *POLDIP2* в культуре клеток приводит к снижению скорости репликации после облучения клеток УФ-светом в той же степени, что и в клетках, нокаутных по гену *PRIMPOL*, а одновременное подавление экспрессии *PRIMPOL* и *POLDIP2* не приводит к большему снижению скорости репликации, что свидетельствует об участии PrimPol и PolDIP2 в одном пути ответа на повреждения ДНК [106]. PolDIP2, вероятно, участвует в регуляции механизмов толерантности к повреждениям ДНК, настраивая баланс между процессами транслезионного синтеза

Установленные взаимодействия PrimPol с белками-партнёрами

Белок-партнёр	Влияние на PrimPol	Ссылки
CHK1-киназа	фосфорилирует Ser255 PrimPol, стимулирует праймазную активность	[95]
PLK1-киназа	фосфорилирует Ser538 PrimPol, подавляет привлечение PrimPol к ДНК	[96]
ATR-киназа	повышает экспрессию <i>PRIMPOL</i> на транскрипционном уровне, стимулирует CHK1-киназу	[16, 95]
USP36	снимает убиквитиновые метки с PrimPol, повышает количество стабильных молекул PrimPol в клетке	[98]
WRNIP1	стимулирует протеасомную деградацию PrimPol	[99]
RPA	стимулирует ДНК-праймазную, ДНК-полимеразную активности PrimPol и активность по вытеснению цепи, способствует привлечению PrimPol к участкам повреждения ДНК	[15, 93, 100, 101]
PolDIP2	повышает сродство PrimPol к ДНК и нуклеотидным субстратам, стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol и активность по вытеснению цепи	[94, 106, 107]
TWINKLE	стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на повреждённых и неповреждённых ДНК-матрицах	[10]

и переключения матриц, но точная роль PolDIP2 в этом механизме не определена [108].

В митохондриях в регуляции активности PrimPol может участвовать ДНК-хеликаза TWINKLE (продукт гена *TWINK*). Показано, что TWINKLE стимулирует ДНК-полимеразную активность PrimPol на повреждённых и неповреждённых ДНК-матрицах [10].

Было показано, что PrimPol может участвовать в прохождении «сшивок» между цепями ДНК [18] и, по-видимому, образует контакты с белками, участвующими в распознавании и репарации этих «сшивок». Методом иммунопреципитации и масс-спектрометрии были идентифицированы белки, потенциально взаимодействующие с PrimPol: белок HERC2 (HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2), участвующий в разрешении G-квадруплексов; белки MHF1 (входящий в состав FANCM-комплекса) и RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), а также белки BLM (Bloom syndrome protein), RMI1 (RecQ-Mediated genome Instability protein) и RMI2 (входящие в состав BTR-комплекса (BLM — топоизомераза IIIα — RMI)), вовлечённые в репарацию межцепочечных ДНК-сшивок [18]. Тем не менее механизмы и роль данных взаимодействий ещё не исследованы.

Данные по регуляции активности PrimPol основными белками суммированы в таблице.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕХАНИЗМА РЕИНИЦИАЦИИ СИНТЕЗА ДНК PrimPol

Множество данных о белок-белковых взаимодействиях и посттрансляционных модификациях PrimPol пока представляет собой разрозненную мозаику, которую ещё только предстоит собрать в общую картину регуляции реинициации синтеза ДНК (рис. 3). Предполагается, что PrimPol реализует механизм реинициации синтеза ДНК на лидирующей цепи, где столкновение реплисома с повреждением ДНК может приводить к остановке Pol ϵ и рассинхронизации реплисома. Участие PrimPol в реинициации ДНК на лидирующей цепи подтверждено экспериментально [19, 95]. На отстающей цепи остановка репликативной ДНКП Pol δ не играет критической роли, поскольку комплекс Pol α –праймаза регулярно синтезирует новые праймеры, которые легко могут быть использованы для преодоления повреждённого участка ДНК. Вероятно, конкуренции между PrimPol и комплексом Pol α –праймаза при реинициации синтеза на разных цепях не возникает: PrimPol демонстрирует

высокоэффективную праймазную активность на лидирующей, но не на отстающей цепи [95], а активность комплекса Pol α –праймаза на лидирующей цепи значительно снижена по сравнению с отстающей цепью [109].

В настоящий момент достоверно неизвестно, с помощью какого сигнального пути происходит регуляция активности PrimPol и распознавание повреждённого участка ДНК. Фосфорилирование PrimPol чекпойнт-протеинкиназой CHK1 [95] позволяет предположить, что механизм реинициации синтеза ДНК PrimPol входит в каскад механизмов, регулируемых сигнальной ATR-киназой и эффекторной CHK1-киназой. Привлечение PrimPol к повреждённой ДНК [15, 100] и активация ATR [110] происходят за счёт взаимодействия с белком RPA, связывающимся с протяжённым участком оцДНК. Было показано, что ATR влияет на экспрессию *PRIMPOL* на транскрипционном уровне: при обработке культуры клеток цисплатином ATR способствует повышению уровня мРНК *PRIMPOL* в клетке [16]. Возможно, ATR влияет на PrimPol и опосредованно через консервативный путь ATR-CLASPIN-зависимой активации CHK1-киназы [65], которая фосфорилирует PrimPol и стимулирует её активность [95]. Тем не менее ни ATR, ни CHK1-киназа не оказывают прямого влияния на локализацию PrimPol в клетке и связывание с хроматином [86].

Между PrimPol и ATR возможна и обратная положительная регуляция. Показано, что синтез новых праймеров после остановки репликативной ДНКП стимулирует активацию ATR [111]. Предполагается, что праймеры, синтезированные в результате реинициации репликации PrimPol, предоставляют 5'-концевые сайты для посадки комплекса 9-1-1 — функционального аналога PCNA, с которым взаимодействуют белки-активаторы ATR [78]. Следовательно, чем больше количество молекул PrimPol и выше их активность, тем больше праймеров она создаёт и тем сильнее активируется ATR. Однако эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

ATR может играть роль и в переключении между процессами реинициации синтеза ДНК PrimPol и другими механизмами толерантности к повреждениям ДНК. В нескольких работах проводилось исследование роли PrimPol в обеспечении ответа на генотоксический стресс в культурах клеток, нокаутных по генам белков, отвечающих за процесс реверсии репликативной вилки [4, 16, 112]. В клетках с нокаутом *BRCA1*, защищающим ревертированные репликативные вилки от нуклеаз,

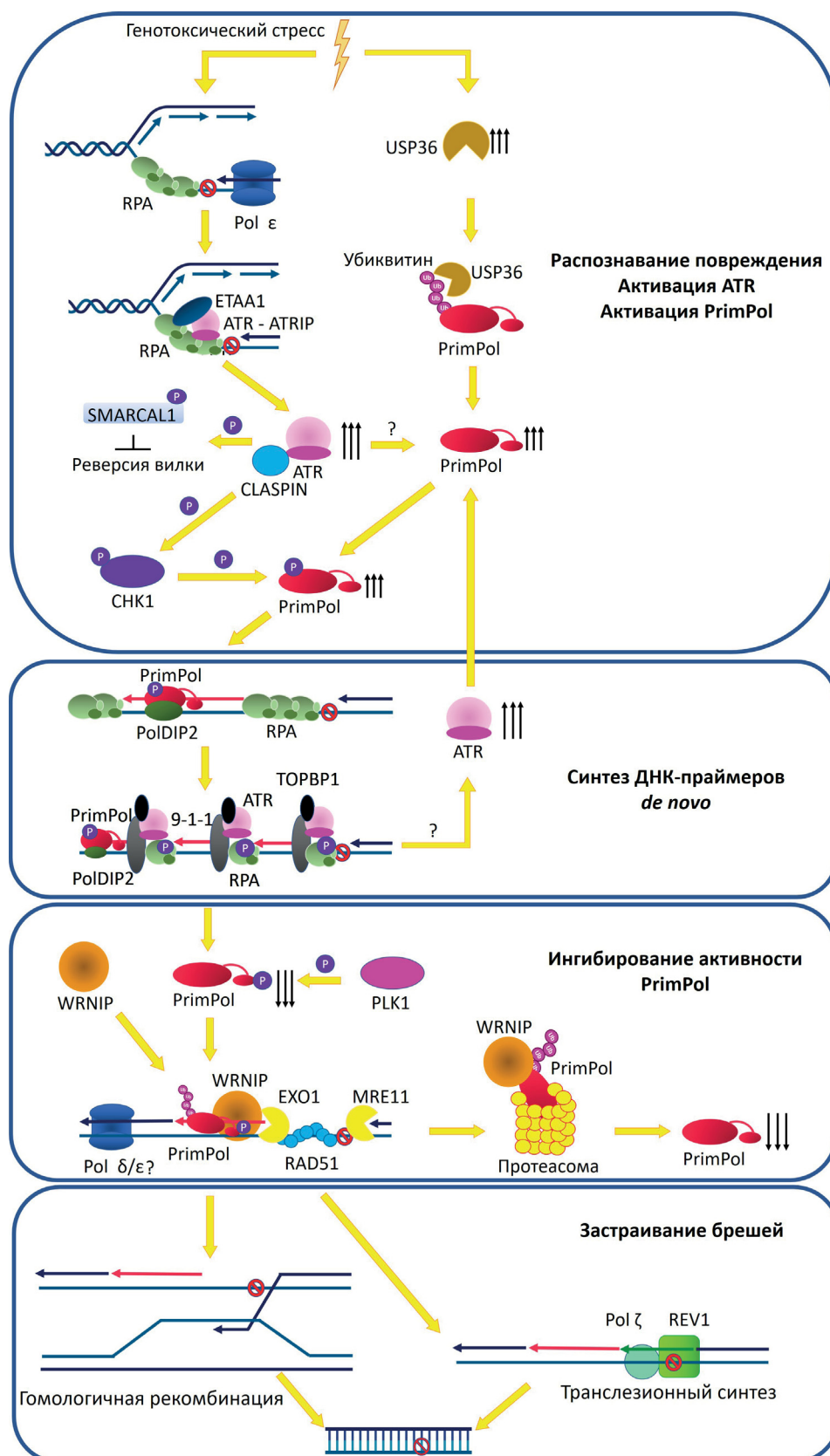


Рис. 3. Возможные пути регуляции активности праймазы-полимеразы PrimPol человека при репликации на повреждённой ДНК в ядре. Красный перечёркнутый круг — повреждение ДНК; чёрные стрелки вверх/вниз — повышение/снижение активности белка; фиолетовый круг «P» — фосфорилирование белка; розовый круг «Ub» — убиквитинирование белка; голубые/синие стрелки — синтез ДНК репликативными ДНКП; красные стрелки — синтез ДНК *de novo* PrimPol; зелёная стрелка — транслезионный синтез REV1/Pol ζ ; знак вопроса — неподтверждённые/неизвестные взаимодействия

однократная обработка цисплатином приводит к инициации реверсии репликативной вилки с последующей нуклеазной деградацией ДНК. Однако многократная обработка цисплатином запускает ATR-зависимую стимуляцию реинициации синтеза ДНК PrimPol и восстановление репликации. При этом при подавлении экспрессии *PRIMPOL* в клетках *BRCA1*^{-/-} снова реализуется процесс реверсии репликативной вилки, и не защищённая от нуклеаз ДНК деградирует [16]. Таким образом, реинициация синтеза ДНК с помощью PrimPol и процесс реверсии репликативной вилки представляют собой конкурирующие механизмы, дополняющие друг друга. Действительно, подавление экспрессии белков, участвующих в реверсии репликативной вилки (опухолевого супрессора BRCA2, рекомбиназы RAD51, транслоказы SMARCA1, хеликазоподобного транскрипционного фактора HLTf (Helicase-like transcription factor)), повышает активность PrimPol [16, 112–114]. А в клетках *PRIMPOL*^{-/-}, наоборот, наблюдается повышение активности RAD51 — одного из основных участников процесса реверсии вилки, а также снижение количества одноцепочечных брешей, генерируемых PrimPol [4]. ATR, вероятно, играет значительную роль в регуляции данного баланса, фосфорилируя белок SMARCA1, что приводит к ингибированию процесса реверсии репликативной вилки [115].

Также недавние исследования показали, что белок PARP1 (Poly-(ADP-ribose)-polymerase 1), участвующий в регуляции репликации и репарации, вносит вклад в регуляцию баланса между реинициацией синтеза и реверсией вилки. PARP1 стабилизирует репликативные вилки в ревертированном состоянии за счёт ингибирования хеликазы RECQ1 (ATP-dependent DNA helicase Q1) [116]. Подавление активности PARP1 за счёт убиквитинирования белком MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) способствует ускоренному разрешению ревертированных репликативных вилок и стимуляции репликации за счёт реинициации синтеза ДНК с помощью PrimPol [117]. И наоборот, стимуляция PARP1-зависимого ингибирования RECQ1 белком CARM1 (Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1) способствует преимущественному использованию механизма реверсии вилки и подавлению реинициации синтеза ДНК PrimPol и транслезионного синтеза [118].

Реинициация синтеза ДНК подразумевает, что ДНК-праймеры, синтезированные PrimPol *de novo*, будут использованы репликативной Pol ϵ или Pol δ для продолжения высокоэффек-

тивного и точного синтеза ДНК. Поскольку PrimPol функционирует преимущественно на лидирующей цепи, то можно предположить, что удлинение новосинтезированных праймеров будет осуществлять Pol ϵ — основная ДНКП лидирующей цепи. Однако привлечение Pol ϵ в репликативную вилку — сложно регулируемый процесс. Pol δ , осуществляющая синтез отстающей цепи, может корректировать ошибки Pol ϵ на лидирующей цепи и участвовать в репликации лидирующей цепи в условиях репликативного стресса при перезапуске репликативной вилки [48–51]. Вопрос того, какая из ДНКП продолжает синтез от праймеров, синтезированных PrimPol, остаётся открытым и требует дополнительных исследований.

Успешная реинициация синтеза ДНК PrimPol позволяет репликативной вилке двигаться дальше, оставляя одноцепочечную брешь между местом остановки репликативной ДНКП на повреждённом участке и новым праймером. Застраивание образовавшейся бреши может происходить с помощью гомологичной рекомбинации и транслезионного синтеза. Было показано, что белок RAD51, играющий ключевую роль в механизме гомологичной рекомбинации, может участвовать в процессинге одноцепочечных брешей, генерируемых PrimPol при синтезе ДНК-праймеров *de novo*. При обработке клеток человека ДНК-повреждающими агентами RAD51 привлекается к одноцепочечным брешам, генерируемым PrimPol, запуская гомологичную рекомбинацию и восстановление целостности ДНК [17]. Размер брешей, образованных PrimPol, в среднем составляет около 14 нуклеотидов [5] и требует процессинга нуклеазами MRE11 (Double-strand break repair protein MRE11) и EXO1 (Exonuclease 1) [17]. Стабилизацию RAD51 на оцДНК и предотвращение чрезмерного обрезания ДНК нуклеазами, возможно, выполняет белок WRNIP1 [119], для которого также показано и взаимодействие с PrimPol [99]. Можно предположить, что WRNIP1 при регуляции активности PrimPol играет двойную роль, контролируя процессинг оцДНК брешей, генерируемых PrimPol, и регулируя количество молекул PrimPol. Заполнение оцДНК брешей, образованных PrimPol, может происходить за счёт транслезионного синтеза специализированными ДНКП, например, REV1 и Pol ζ [120].

Итак, рассмотрим возможные пути регуляции активности праймазы-полимеразы PrimPol человека при репликации на повреждённой ДНК в ядре (рис. 3).

Под действием генотоксического стресса происходит рассинхронизация реплицомы и накопление одноцепочечных фрагментов ДНК [73, 74], связанных с белком RPA, который служит сигналом для активации сигнальной системы ATR-киназы белками-активаторами и медиаторами (9-1-1, ATRIP, ETAA1, TOPBP1, CLASPIN) [76, 78, 110]. Для осуществления механизма реинициации синтеза ДНК необходимо отключить альтернативный механизм реверсии репликативной вилки посредством фосфорилирования белка SMARCA1 ATR-киназой [115], подавления активности PARP1 [117] или других путей. Далее происходит увеличение количества стабильных молекул PrimPol в клетке за счёт повышения экспрессии PrimPol под действием ATR-киназы [16] и за счёт снижения протеолиза молекул PrimPol благодаря снятию с них убиквитиновых меток деубиквитиной USP36 [98]. Активация сигнального пути ATR-киназы подразумевает CLASPIN-опосредованное фосфорилирование чекпойнт-киназы CHK1 [65]. CHK1 фосфорилирует PrimPol по консервативному остатку Ser255 в неструктурированной петле каталитического центра белка, что способствует повышению активности PrimPol [95]. Активированная PrimPol с высокой эффективностью связывается с белком RPA [95], запуская синтез праймеров *de novo* [3, 15, 86]. Белок PolDIP2 может повышать сродство PrimPol к ДНК и нуклеотидным субстратам и стимулировать её активность, однако точная роль PolDIP2 в регуляции инициации синтеза ДНК PrimPol *de novo* неясна [14, 93, 101, 106, 107]. Возможно, образование новых ДНК-праймеров стимулирует дальнейшую активацию ATR-киназы за счёт связывания с праймерами активирующего комплекса 9-1-1–TOPBP1 [111], в результате чего может реализовываться цикл с положительной обратной связью между PrimPol и ATR. Праймеры, синтезированные PrimPol, используют для дальнейшего синтеза одна из репликативных ДНКП [48–50]. После успешного восстановления движения репликативной вилки PrimPol необходимо удалить. Фосфорилирование протеинкиназой PLK1 остатка PrimPol Ser538, располагающегося в С-концевой области между двумя мотивами связывания белка RPA, приводит, предположительно, к нарушению взаимодействия с RPA и ДНК [96]. Белок WRNIP взаимодействует с убиквитинированной PrimPol и стимулирует её разрушение протеасомой [99], при этом WRNIP также может играть роль в стабилизации одноцепочечной бреши, оставленной PrimPol, и в стабилизации белка RAD51 [119]. На заключительном этапе

одноцепочечные бреши, возникшие в результате работы PrimPol, застраиваются в ходе гомологичной рекомбинации [17] или транслезионного синтеза [120].

НАРУШЕНИЯ В СТРУКТУРЕ PrimPol И ИХ СВЯЗЬ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Исследования показали, что мыши, дефектные по PrimPol, жизнеспособны, однако клетки, в которых подавлена её экспрессия, испытывают репликативный стресс, демонстрируют генетическую нестабильность и нарушения митохондриальной репликации [2]. Предположительно отсутствие PrimPol может быть компенсировано *in vivo* альтернативными механизмами: репликацией повреждённой ДНК и участков ДНК с неканоническими структурами при участии других ДНКП и хеликаз, механизмами переключения матриц и гомологичной рекомбинации, а также пробуждением «спящих» точек начала репликации. Было показано, что клетки лимфоцитов курицы DT40 с недостатком только PrimPol или Pol η/Pol ζ жизнеспособны и пролиферируют с нормальной скоростью. Однако клетки с одновременным дефицитом PrimPol и Pol η/Pol ζ медленно пролиферируют и быстро погибают при культивировании. Эти данные позволяют предположить, что механизмы толерантности к повреждениям, в которых участвуют PrimPol и Pol η/Pol ζ, не перекрываются и компенсируют друг друга [5].

Мутации *PRIMPOL* предположительно могут вносить вклад в развитие некоторых заболеваний у человека, таких как наследственные митохондриальные патологии (например, мышечные дистрофии и офтальмологические болезни) и злокачественные опухоли. Секвенирование экзона пациентов с наследственной миопией высокой степени, проведённое Zhao F. et al., выявило связь между развитием заболевания и миссенс-мутацией (NM_152683.2: c.265T>G) гена *PRIMPOL*, которая приводит к аминокислотной замене Y89D. Данная мутация была обнаружена в одном случае семейного заболевания и у четырёх спорадических пациентов с миопией высокой степени [20]. Аминокислотная замена Y89D вызывает значительные конформационные изменения в полимеразном домене PrimPol человека и существенно снижает её активность [20]. Мутантный белок PrimPol (Y89D) обладает сниженным сродством к dNTP и ДНК-матрице и процессивностью. Кроме того, вариант PrimPol

с заменой Y89D неспособен синтезировать РНК-праймеры, но сохраняет способность к синтезу ДНК-праймеров [21]. Данные, полученные *in vitro*, коррелируют с данными исследований *in vivo*. Аминокислотная замена Y89D в PrimPol приводит к повышению чувствительности клеток к УФ-излучению, сравнимому с эффектом отсутствия PrimPol [21]. Однако секвенирование генома, проведённое Li L. et al., не показало чёткой связи между аминокислотной заменой Y89D в PrimPol и развитием болезни. Согласно данным Li L. et al. вариант PrimPol (Y89D) был обнаружен как у пациентов с миопией, так и у пациентов с другими заболеваниями органов зрения, а также у здоровых людей [121]. Позже был исследован ещё один случай семейного наследования данной мутации, возникшей *de novo* у мужчины, страдающего миопией высокой степени. Родители мужчины были носителями гена *PRIMPOL* дикого типа и обладали абсолютным зрением, в то время как его сын унаследовал мутацию и проявлял признаки нарушения общего развития и зрения [122]. Также данная мутация была обнаружена у пациентов с прогрессирующей наружной офтальмоплегией, возникающей в результате мутаций митохондриальной ДНК [22]. Таким образом, нельзя исключать, что нарушение функционирования PrimPol с заменой Y89D приводит к патологии. Требуется дополнительные исследования.

Замена Y100H PrimPol была обнаружена в образцах рака лёгкого. Данная замена приводит к потере PrimPol способности дискриминировать рибо- и дезоксирибонуклеотиды, что выражается в повышении эффективности включения рибонуклеотидов. Она может способствовать выживаемости раковых клеток на ранних стадиях онкогенеза, когда снижается пул доступных dNTP [24].

Две другие аминокислотные замены, F522V и I554T, располагающиеся в мотиве, отвечающем за связывание PrimPol с RPA, также были обнаружены у онкологических пациентов. Данные замены значительно снижали способность PrimPol связывать RPA *in vitro* [15], хотя связь с онкологическими заболеваниями для данных замен пока не была доказана.

Анализ данных по экспрессии генов человека в рамках проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas) показал, что нарушение экспрессии *PRIMPOL* потенциально может быть ассоциировано с развитием некоторых онкологических заболеваний [123]. В частности, большое число делеций в гене *PRIMPOL* было обнаружено у пациенток с инвазивными лобулярными (дольковыми) и про-

токовыми карциномами груди. В недавней работе был проведён анализ баз данных COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) и GDC (Genomic Data Commons) [124]. В результате было обнаружено множество соматических мутаций в гене *PRIMPOL*, затрагивающих активный центр фермента (R76H, Y100H, K165N), участки связывания с регуляторными белками PolDIP2 и RPA (G201D, H214Y, F522V и др.) и мотив ZnF (R417L, R417W, H426N, H426R). Однако на сегодняшний день подробно исследованы каталитические свойства только нескольких вариантов PrimPol из множества обнаруженных [15, 24].

Нарушение функции PrimPol может быть связано и со случаями непереносимости препаратов антиретровирусной терапии. В частности, замена D114N, затрагивающая активный центр PrimPol, была обнаружена у ВИЧ-положительных пациентов, страдающих от митохондриальной токсичности в результате приёма препарата тенофовир. Данная аминокислотная замена подавляет праймазную и ДНК-полимеразную активности PrimPol, в результате чего снижается защита от побочного действия тенофовира, ингибирующего митохондриальную репликацию [23].

Продолжение исследований функций и свойств PrimPol человека может иметь важное медицинское значение и необходимо для понимания механизмов развития заболеваний, связанных с нарушением стабильности генома и клеточного ответа на факторы, повреждающие ДНК.

НЕРЕШЁННЫЕ ВОПРОСЫ

Представленная на рис. 3 схема регуляции PrimPol является попыткой объединения всех имеющихся на данный момент сведений в один механизм, но всё же не даёт полного понимания происходящего. Многие предполагаемые взаимосвязи не доказаны экспериментально. Остаётся множество открытых вопросов, для ответа на которые необходимы дальнейшие исследования. Например: какую роль в регуляции механизма реинициации синтеза PrimPol играет белок PolDIP2? Каков молекулярный механизм стимуляции активности PrimPol RPA? Какая из репликативных ДНКП, Pol ϵ или Pol δ , в клетке продолжает синтез ДНК с праймеров, созданных PrimPol? Каким образом происходит регуляция работы PrimPol в митохондриях, и какую роль играет взаимодействие PrimPol с хеликазой TWINKLE? Таким образом, анализ механизма регуляции активности PrimPol и путей реинициации синтеза ДНК

является актуальным направлением дальнейших исследований.

Вклад авторов. Болдинова Е.О. — анализ литературы, написание черновика статьи; Макарова А.В. — редактирование статьи.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-24-20150 (БЕО).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ю.И. Павлову и А.Г. Барановскому за ценную дискуссию и советы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., and Aravind, L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3875–3896, doi: 10.1093/nar/gki702.
- García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, S., Mourón, S., Terrados, G., Powell, C., Salido, E., Méndez, J., Holt, I. J., and Blanco, L. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541–553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
- Wan, L., Lou, J., Xia, Y., Su, B., Liu, T., Cui, J., Sun, Y., Lou, H., and Huang, J. (2013) HPrimpoll/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity, *EMBO Rep.*, **14**, 1104–1112, doi: 10.1038/embor.2013.159.
- Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., Taylor, E., Stevanovic, I., Green, A. J., Stracker, T. H., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566–573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
- Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleoside, *Cell Cycle*, **15**, 1997–2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
- Bailey, L. J., Bianchi, J., Hégarat, N., Hochegeger, H., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol-deficient cells exhibit a pronounced G2 checkpoint response following UV damage, *Cell Cycle*, **15**, 908–918, doi: 10.1080/15384101.2015.1128597.
- Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2019) PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4026–4038, doi: 10.1093/nar/gkz056.
- Makarova, A. V., Boldinova, E. O., Belousova, E. A., and Lavrik, O. I. (2018) *In vitro* lesion bypass by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **70**, 18–24, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.009.
- Keen, B. A., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2014) Molecular dissection of the domain architecture and catalytic activities of human PrimPol, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 5830–5845, doi: 10.1093/nar/gku214.
- Stojkovic, G., Makarova, A. V., Wanrooij, P. H., Forslund, J., Burgers, P. M. J., and Wanrooij, S. (2016) Oxidative DNA damage stalls the human mitochondrial replisome, *Sci. Rep.*, **6**, 28942, doi: 10.1038/srep28942.
- Zafar, M. K., Ketkar, A., Lodeiro, M. F., Cameron, C. E., and Eoff, R. L. (2014) Kinetic analysis of human PrimPol DNA polymerase activity reveals a generally error-prone enzyme capable of accurately bypassing 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochemistry*, **53**, 6584–6594, doi: 10.1021/bi501024u.
- Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Bebenek, K., Sastre-Moreno, G., Calvo, P. A., Díaz-Talavera, A., Kunkel, T. A., and Blanco, L. (2015) Alternative solutions and new scenarios for translesion DNA synthesis by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **29**, 127–138, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.013.
- Boldinova, E. O., Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Gagarinskaya, D. I., Baranovskiy, A. G., Tahirov, T. H., Zharkov, D. O., and Makarova, A. V. (2021) Translesion activity of PrimPol on DNA with cisplatin and DNA-protein cross-links, *Sci. Rep.*, **11**, 17588, doi: 10.1038/s41598-021-96692-y.
- Boldinova, E. O., Ghodke, P. P., Sudhakar, S., Mishra, V. K., Manukyan, A. A., Miropolskaya, N., Pradeepkumar, P. I., and Makarova, A. V. (2022) Translesion synthesis across the N²-Ethyl-deoxyguanosine adduct by human PrimPol, *ACS Chem. Biol.*, **17**, 3238–3250, doi: 10.1021/acscchembio.2c00717.
- Guillian, T. A., Brissett, N. C., Ehlinger, A., Keen, B. A., Kolesar, P., Taylor, E., Bailey, L. J., Lindsay, H. D., Chazin, W. J., and Doherty, A. J. (2017) Molecular basis for PrimPol recruitment to replication forks by RPA, *Nat. Commun.*, **8**, 15222, doi: 10.1038/ncomms15222.
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., Carvajal-Maldonado, D., González-

- Acosta, D., Vessoni, A. T., Cybulla, E., Wood, M., Tavis, S., Batista, L. F. Z., Méndez, J., Sale, J. S., and Vindigni, A. (2019) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells, *Mol. Cell*, **77**, 461-474.e9, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
17. Piberger, A. L., Bowry, A., Kelly, R., Walker, A. K., Gonzalez, D., Bailey, L. J., Doherty, A. J., Méndez, J., Morris, J. R., Bryant, H. E., and Petermann, E. (2020) PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates homologous recombination at bulky DNA adducts, *Nat. Commun.*, **11**, 5863, doi: 10.1038/s41467-020-19570-7.
18. González-Acosta, D., Blanco-Romero, E., Ubieto-Capella, P., Mutreja, K., Míguez, S., Llanos, S., García, F., Muñoz, J., Blanco, L., Lopes, M., and Méndez, J. (2021) PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks, *EMBO J.*, **40**, e106355, doi: 10.15252/embj.2020106355.
19. Schiavone, D., Jozwiakowski, S. K., Romanello, M., Guilbaud, G., Guillian, T. A., Bailey, L. J., Sale, J. E., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells, *Mol. Cell*, **61**, 161-169, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.038.
20. Zhao, F., Wu, J., Xue, A., Su, Y., Wang, X., Lu, X., Zhou, Z., Qu, J., and Zhou, X. (2013) Exome sequencing reveals CCDC111 mutation associated with high myopia, *Hum. Genet.*, **132**, 913-921, doi: 10.1007/s00439-013-1303-6.
21. Keen, B. A., Bailey, L. J., Jozwiakowski, S. K., and Doherty, A. J. (2014) Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12102-12111, doi: 10.1093/nar/gku879.
22. Kasamo, K., Nakamura, M., Daimou, Y., and Sano, A. (2020) A PRIMPOL mutation and variants in multiple genes may contribute to phenotypes in a familial case with chronic progressive external ophthalmoplegia symptoms, *Neurosci. Res.*, **157**, 58-63, doi: 10.1016/j.neures.2019.07.006.
23. Duong, V. N., Zhou, L., Martínez-Jiménez, M. I., He, L., Cosme, M., Blanco, L., Paintsil, E., Anderson, K. S. (2020) Identifying the role of PrimPol in TDF-induced toxicity and implications of its loss of function mutation in an HIV⁺ patient, *Sci. Rep.*, **10**, 9343, doi: 10.1038/s41598-020-66153-z.
24. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., Blanco-Franco, L., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., Méndez, J., and Blanco, L. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
25. Picher, Á. J., Budeus, B., Wafzig, O., Krüger, C., García-Gómez, S., Martínez-Jiménez, M. I., Díaz-Talavera, A., Weber, D., Blanco, L., and Schneider, A. (2016) TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol, *Nat. Commun.*, **7**, 13296, doi: 10.1038/ncomms13296.
26. Agudo, R., Calvo, P. A., Martínez-Jiménez, M. I., and Blanco, L. (2017) Engineering human PrimPol into an efficient RNA-dependent-DNA primase/polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9046-9058, doi: 10.1093/nar/gkx633.
27. Boldinova, E. O., Wanrooij, P. H., Shilkin, E. S., Wanrooij, S., and Makarova, A. V. (2017) DNA damage tolerance by eukaryotic DNA polymerase and primase PrimPol, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1584, doi: 10.3390/ijms18071584.
28. Tirman, S., Cybulla, E., Quinet, A., Meroni, A., and Vindigni, A. (2020) PRIMPOL ready, set, re-prime! *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **56**, 17-30, doi: 10.1080/10409238.2020.1841089.
29. Baretic, D., Jenkyn-Bedford, M., Aria, V., Cannone, G., Skehel, M., and Yeeles, J. T. P. (2020) Cryo-EM structure of the fork protection complex bound to CMG at a replication fork, *Mol. Cell*, **78**, 926-940.e13, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.012.
30. Jones, M. L., Baris, Y., Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2021) Structure of a human replisome shows the organisation and interactions of a DNA replication machine, *EMBO J.*, **40**, e108819, doi: 10.15252/embj.2021108819.
31. Yuan, Z., Georgescu, R., Santos, R. L. A., Zhang, D., Bai, L., Yao, N. Y., Zhao, G., O'Donnell, M. E., and Li, H. (2019) Ctf4 organizes sister replisomes and Pol α into a replication factory, *eLife*, **8**, e47405, doi: 10.7554/eLife.47405.
32. Rzechorzek, N. J., Hardwick, S. W., Jatikusumo, V. A., Chirgadze, D. Y., and Pellegrini, L. (2020) CryoEM structures of human CMG-ATP γ S-DNA and CMG-AND-1 complexes, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6980-6995, doi: 10.1093/nar/gkaa429.
33. Kapadia, N., El-Hajj, Z. W., Zheng, H., Beattie, T. R., Yu, A., and Reyes-Lamothe, R. (2020) Processive activity of replicative DNA polymerases in the replisome of live eukaryotic cells, *Mol. Cell*, **80**, 114-126.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2020.08.014.
34. Lewis, J. S., Spenkelink, L. M., Schauer, G. D., Yurieva, O., Mueller, S. H., Natarajan, V., Kaur, G., Maher, C., Kay, C., O'Donnell, M. E., and van Oijen, A. M. (2020) Tunability of DNA polymerase stability during eukaryotic DNA replication, *Mol. Cell*, **77**, 17-25.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.005.
35. Donnell, M. O., and Li, H. (2016) The eukaryotic replisome goes under the microscope, *Curr. Biol.*, **26**, R247-R256, doi: 10.1016/j.cub.2016.02.034.
36. Bleichert, F., Botchan, M. R., and Berger, J. M. (2017) Mechanisms for initiating cellular DNA replication, *Science*, **355**, eaah6317, doi: 10.1126/science.aah6317.
37. Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., and Diffley, J. F. X. (2009) Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA

- during DNA replication origin licensing, *Cell*, **139**, 719-730, doi: 10.1016/j.cell.2009.10.015.
38. Tanaka, S., and Araki, H. (2013) Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010371, doi: 10.1101/cshperspect.a010371.
39. Perez-Arnaiz, P., Bruck, I., and Kaplan, D. L. (2016) Mcm10 coordinates the timely assembly and activation of the replication fork helicase, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 315-329, doi: 10.1093/nar/gkv1260.
40. Kim, C., Paulus, B. F., and Wold, M. S. (1994) Interactions of human replication protein A with oligonucleotides, *Biochemistry*, **33**, 14197-14206, doi: 10.1021/bi00251a031.
41. Yates, L. A., Aramayo, R. J., Pokhrel, N., Caldwell, C. C., Kaplan, J. A., Perera, R. L., Spies, M., Antony, E., and Zhang, X. (2018) A structural and dynamic model for the assembly of replication protein A on single-stranded DNA, *Nat. Commun.*, **9**, 5447, doi: 10.1038/s41467-018-07883-7.
42. Pestryakov, P. E., and Lavrik, O. I. (2008) Mechanisms of single-stranded DNA-binding protein functioning in cellular DNA metabolism, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1388-1404, doi: 10.1134/S0006297908130026.
43. Bhat, K. P., and Cortez, D. (2018) RPA and RAD51: fork reversal, fork protection, and genome stability, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 446-453, doi: 10.1038/s41594-018-0075-z.
44. Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., and Shell, S. M. (2006) Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses, *J. Cell Physiol.*, **208**, 267-273, doi: 10.1002/jcp.20622.
45. Jain, R., Aggarwal, A. K., and Rechkoblit, O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **53**, 77-87, doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003.
46. Baranovskiy, A. G., Babayeva, N. D., Zhang, Y., Gu, J., Suwa, Y., Pavlov, Y. I., and Tahirov, T. H. (2016) Mechanism of concerted RNA-DNA primer synthesis by the human primosome, *J. Biol. Chem.*, **291**, 10006-10020, doi: 10.1074/jbc.M116.717405.
47. Goswami, P., Abid Ali, F., Douglas, M. E., Locke, J., Purkiss, A., Janska, A., Eickhoff, P., Early, A., Nans, A., Cheung, A. M. C., Diffley, J. F. X., and Costa, A. (2018) Structure of DNA-CMG-Pol epsilon elucidates the roles of the non-catalytic polymerase modules in the eukaryotic replisome, *Nat. Commun.*, **9**, 5061, doi: 10.1038/s41467-018-07417-1.
48. Guillian, T. A., and Yeeles, J. T. (2021) The eukaryotic replisome tolerates leading-strand base damage by replicase switching, *EMBO J.*, **40**, e107037, doi: 10.15252/embj.2020107037.
49. Miyabe, I., Mizuno, K., Keszthelyi, A., Daigaku, Y., Skouteri, M., Mohebi, S., Kunkel, T. A., Murray, J. M., and Carr, A. M. (2015) Polymerase δ replicates both strands after homologous recombination-dependent fork restart, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 932-938, doi: 10.1038/nsmb.3100.
50. Zhou, Z.-X., Lujan, S. A., Burkholder, A. B., Charles, J. S., Dahl, J., Farrell, C. E., Williams, J. S., and Kunkel, T. A. (2021) How asymmetric DNA replication achieves symmetrical fidelity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 1020-1028, doi: 10.1038/s41594-021-00691-6.
51. Bullock, C. R., Xing, X., and Shcherbakova, P. V. (2020) DNA polymerase δ proofreads errors made by DNA polymerase ϵ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6035-6041, doi: 10.1073/pnas.1917624117.
52. Sun, H., Ma, L., Tsai, Y., Abeywardana, T., Shen, B., and Zheng, L. (2022) Okazaki fragment maturation: DNA flap dynamics for cell proliferation and survival, *Trends Cell Biol.*, **33**, 221-234, doi: 10.1016/j.tcb.2022.06.014.
53. Stodola, J. L., and Burgers, P. M. J. (2017) Mechanism of lagging-strand DNA replication in eukaryotes, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1042**, 117-133, doi: 10.1007/978-981-10-6955-0-6.
54. Sobhy, M. A., Tehseen, M., Takahashi, M., Bralić, A., Biasio, A. De, and Hamdan, S. M. (2021) Implementing fluorescence enhancement, quenching, and FRET for investigating flap endonuclease 1 enzymatic reaction at the single-molecule level, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 4456-4471, doi: 10.1016/j.csbj.2021.07.029.
55. Liu, S., Lu, G., Ali, S., Liu, W., Zheng, L., Dai, H., Li, H., Xu, H., Hua, Y., Zhou, Y., Ortega, J., Li, G., Kunkel, T. A., and Shen, B. (2015) Okazaki fragment maturation involves α -segment error editing by the mammalian FEN 1/MutSa functional complex, *EMBO J.*, **34**, 1829-1843, doi: 10.15252/embj.201489865.
56. Howes, T. R. L., and Tomkinson, A. E. (2012) DNA ligase I, the replicative DNA ligase, *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function* (MacNeill, S., ed.) Dordrecht, Springer, pp. 327-341, doi: 10.1007/978-94-007-4572-8.
57. Sverzhinsky, A., Tomkinson, A. E., and Pascal, J. M. (2022) Cryo-EM structures and biochemical insights into heterotrimeric PCNA regulation of DNA ligase, *Structure*, **30**, 371-385.e5, doi: 10.1016/j.str.2021.11.002.
58. Gonzalez-Magana, A., and Blanco, F. J. (2020) Human PCNA structure, function, and interactions, *Bio-molecules*, **10**, 570, doi: 10.3390/biom10040570.
59. Stokes, K., Winczura, A., Song, B., De Piccoli, G., and Grabarczyk, D. B. (2020) Ctf18-RFC and DNA Pol epsilon form a stable leading strand polymerase/clamp loader complex required for normal and perturbed DNA replication, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8128-8145, doi: 10.1093/nar/gkaa541.
60. Baris, Y., Taylor, M. R. G., Aria, V., and Yeeles, J. T. P. (2022) Fast and efficient DNA replication with purified human proteins, *Nature*, **606**, 204-210, doi: 10.1038/s41586-022-04759-1.
61. Chilkova, O., Stenlund, P., Isoz, I., Stith, C. M., Burgers, P. M., and Johansson, E. (2007) The eu-

- karyotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6588-6597, doi: 10.1093/nar/gkm741.
62. Lancey, C., Tehseen, M., Raducanu, V., Rashid, F., Merino, N., Ragan, T. J., Savva, C. G., Zaher, M. Z., Shirbini, A., Blanco, F. J., Hamdan, S. M., and De Biasio, A. (2020) Structure of the processive human Pol δ holoenzyme, *Nat. Commun.*, **11**, 1109, doi: 10.1038/s41467-020-14898-6.
 63. Craggs, T. D., Hutton, R. D., Brenlla, A., White, M. F., and Penedo, J. C. (2014) Single-molecule characterization of Fen1 and Fen1/PCNA complexes acting on flap substrates, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1857-1872, doi: 10.1093/nar/gkt1116.
 64. Smits, V. A. J., Cabrera, E., Freire, R., and Gillespie, D. A. (2019) Claspin – checkpoint adaptor and DNA replication factor, *EMBO J.*, **286**, 441-455, doi: 10.1111/febs.14594.
 65. Hsiao, H. W., Chun, C., and Hisao, Y. (2021) Roles of Claspin in regulation of DNA replication, replication stress responses and oncogenesis in human cells, *Genome Instab. Dis.*, **2**, 263-280, doi: 10.1007/s42764-021-00049-8.
 66. Bertoli, C., Skotheim, J. M., De Bruin, R. A. M., and Street, G. (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 518-528, doi: 10.1038/nrm3629.
 67. Hume, S., Dianov, G. L., and Ramadan, K. (2020) A unified model for the G1/S cell cycle transition, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12483-12501, doi: 10.1093/nar/gkaa1002.
 68. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 153-166, doi: 10.1038/nrc2602.
 69. Mujwar, S., Mojzych, M., and Kontek, R. (2022) Cyclin-dependent kinases in DNA damage response, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1877**, 188716, doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188716.
 70. Williams, A. B., and Schumacher, B. (2016) p53 in the DNA-damage-repair process, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a026070, doi: 10.1101/cshperspect.a026070.
 71. Barnum, K. J., and Connell, M. J. O. (2014) Cell cycle regulation by checkpoints, *Methods Mol. Biol.*, **1170**, 29-40, doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2.
 72. Patil, M., Pabla, N., and Dong, Z. (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 4009-4021, doi: 10.1007/s00018-013-1307-3.
 73. Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2019) Dynamics of replication fork progression following helicase–polymerase uncoupling in eukaryotes, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2040-2049, doi: 10.1016/j.jmb.2019.03.011.
 74. Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J. C., and Cimprich, K. A. (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint, *Genes Dev.*, **19**, 1040-1052, doi: 10.1101/gad.1301205.
 75. Wong, R. P., Garcia-Rodriguez, N., Zilio, N., Hanulova, M., and Ulrich, H. (2020) Processing of DNA polymerase-blocking lesions during genome replication is spatially and temporally segregated from replication forks, *Mol. Cell*, **77**, 3-16.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.015.
 76. Zou, L., and Elledge, S. J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA–ssDNA complexes, *Science*, **300**, 1542-1548, doi: 10.1126/science.1083430.
 77. Blackford, A. N., and Jackson, S. P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell*, **66**, 801-817, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
 78. Saldivar, J. C., Cortez, D., and Cimprich, K. A. (2017) The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 622-636, doi: 10.1038/nrm.2017.67.
 79. Cimprich, K. A., and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 616-627, doi: 10.1038/nrm2450.
 80. Li, X., and Heyer, W.-D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance, *Cell Res.*, **18**, 99-113, doi: 10.1038/cr.2008.1.
 81. Chang, D. J., and Cimprich, K. A. (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 82-90, doi: 10.1038/nchembio.139.
 82. Neelsen, K. J., and Lopes, M. (2015) Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 207-220, doi: 10.1038/nrm3935.
 83. Berti, M., Cortez, D., and Lopes, M. (2020) The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 633-651, doi: 10.1038/s41580-020-0257-5.
 84. Calvo, P. A., Sastre-Moreno, G., Perpiñá, C., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., and Blanco, L. (2019) The invariant glutamate of human PrimPol DxEx motif is critical for its Mn²⁺-dependent distinctive activities, *DNA Repair (Amst.)*, **77**, 65-75, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.03.006.
 85. Boldinova, E. O., Manukyan, A. A., and Makarova, A. V. (2021) The DNA ligands Arg47 and Arg76 are crucial for catalysis by human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **100**, 103048, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103048.
 86. Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L., and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1383-1389, doi: 10.1038/nsmb.2719.

87. Martínez-Jiménez, M. I., Calvo, P. A., García-Gómez, S., Guerra-González, S., and Blanco, L. (2018) The Zn-finger domain of human PrimPol is required to stabilize the initiating nucleotide during DNA priming, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4138-4151, doi: 10.1093/nar/gky230.
88. Tokarsky, E. J., Wallenmeyer, P. C., Phi, K. K., and Suo, Z. (2016) Significant impact of divalent metal ions on the fidelity, sugar selectivity, and drug incorporation efficiency of human PrimPol, *DNA Repair (Amst.)*, **49**, 51-59, doi: 10.1016/j.dnarep.2016.11.003.
89. Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines, *Mol. Cel. Biochem.*, **140**, 1-22, doi: 10.1007/BF00928361.
90. McElhinny, S. A., Watts, B. E., Kumar, D., Watt, D. L., and Lundström, E. (2010) Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4949-4954, doi: 10.1073/pnas.0914857107.
91. Blanco, L., Calvo, P. A., Diaz-Talavera, A., Carvalho, G., Calero, N., Martínez-Carrón, A., Velázquez-Ruiz, C., Villadangos, S., Guerra, S., and Martínez-Jiménez, M. I. (2019) Mechanism of DNA primer synthesis by human PrimPol, *Enzymes*, **45**, 289-310, doi: 10.1016/bs.enz.2019.06.003.
92. Butler, T. J., Estep, K. N., Sommers, J. A., Maul, R. W., Moore, A. Z., Bandinelli, S., Cucca, F., Tuke, M. A., Wood, A. R., Bharti, S. K., Bogenhagen, D. F., Yakubovskaya, E., Garcia-Diaz, M., Guillian, T. A., Byrd, A. K., Raney, K. D., Doherty, A. J., Ferrucci, L., Schlessinger, D., Ding, J., and Brosh, R. M., Jr. (2020) Mitochondrial genetic variation is enriched in G-quadruplex regions that stall DNA synthesis *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1292-1309, doi: 10.1093/hmg/ddaa043.
93. Boldinova, E. O., Belousova, E. A., Gagarinskaya, D. I., Maltseva, E. A., Khodyreva, S. N., Lavrik, O. I., and Makarova, A. V. (2020) Strand displacement activity of PrimPol, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9027, doi: 10.3390/ijms21239027.
94. Torregrosa-Muñumer, R., Forslund, J., Goffart, S., Pfeiffer, A., Stojkovic, G., Carvalho, G., Al-Furoukh, N., Blanco, L., Wanrooij, S., and Pohjoismäki, J. L. O. (2017) PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11398-11403, doi: 10.1073/pnas.1705367114.
95. Mehta, K. P. M., Thada, V., Zhao, R., Krishnamoorthy, A., Leser, M., Rose, K. L., and Cortez, D. (2022) CHK1 phosphorylates PRIMPOL to promote replication stress tolerance, *Sci. Adv.*, **8**, eabm0314, doi: 10.1126/sciadv.abm0314.
96. Bailey, L. J., Teague, R., Kolesar, P., Bainbridge, L. J., Lindsay, H. D., and Doherty, A. J. (2021) PLK1 regulates the PrimPol damage tolerance pathway during the cell cycle, *Sci. Adv.*, **7**, eabh1004, doi: 10.1126/sciadv.abh1004.
97. Keiji, T. (2009) The proteasome: overview of structure and functions, *Proc. Jpn.*, **85**, 12-36, doi: 10.2183/pjab/85.12.
98. Yan, Y., Xu, Z., Huang, J., Guo, G., Gao, M., Kim, W., Zeng, X., Kloeber, J. A., Zhu, Q., Zhao, F., Luo, K., and Lou, Z. (2020) The deubiquitinase USP36 regulates DNA replication stress and confers therapeutic resistance through PrimPol stabilization, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12711-12726, doi: 10.1093/nar/gkaa1090.
99. Yoshimura, A., Oikawa, M., Jinbo, H., Hasegawa, Y., Enomoto, T., and Seki, M. (2019) WRNIP1 controls the amount of PrimPol, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 764-769, doi: 10.1248/bpb.b18-00955.
100. Guillian, T. A., Jozwiakowski, S. K., Ehlinger, A., Barnes, R. P., Rudd, S. G., Bailey, L. J., Skehel, J. M., Eckert, K. A., Chazin, W. J., and Doherty, A. J. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1056-1068, doi: 10.1093/nar/gku1321.
101. Martínez-Jiménez, M. I., Lahera, A., and Blanco, L. (2017) Human PrimPol activity is enhanced by RPA, *Sci. Rep.*, **7**, 783, doi: 10.1038/s41598-017-00958-3.
102. Boldinova, E. O., Baranovskiy, A. G., Gagarinskaya, D. I., Manukyan, A. A., Makarova, A. V., and Tahirov, T. H. (2023) The role of catalytic and regulatory domains of human PrimPol in DNA binding and synthesis, *Nucleic Acids Res.*, gkad507, doi: 10.1093/nar/gkad507.
103. Gagarinskaya, D. I., and Makarova, A. V. (2020) A multifunctional protein PolDIP2 in DNA translesion synthesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1241**, 35-45, doi: 10.1007/978-3-030-41283-8-3.
104. Maga, G., Crespan, E., Markkanen, E., Imhof, R., Furrer, A., Villani, G., Hübscher, U., and Van Loon, B. (2013) DNA polymerase δ -interacting protein 2 is a processivity factor for DNA polymerase λ during 8-oxo-7,8-dihydroguanine bypass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 18850-18855, doi: 10.1073/pnas.1308760110.
105. Tissier, A., Janel-Bintz, R., Coulon, S., Klaile, E., Kannouche, P., Fuchs, R. P. P., and Cordonnier, A. M. (2010) Crosstalk between replicative and translesional DNA polymerases: PDIP38 interacts directly with Pol η , *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 922-928, doi: 10.1016/j.dnarep.2010.04.010.
106. Guillian, T. A., Bailey, L. J., Brissett, N. C., and Doherty, A. J. (2016) PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3317-3329, doi: 10.1093/nar/gkw175.
107. Kazutoshi, K., Stojković, G., Velázquez-Ruiz, C., Martínez-Jiménez, M. I., Doimo, M., Laurent, T., Berner, A., Pérez-Rivera, A. E., Jenner, L., Blanco, L., and Wanrooij, S. (2021) A unique arginine cluster in PolDIP2 enhances nucleotide binding

- and DNA synthesis by PrimPol, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 2179-2191, doi: 10.1093/nar/gkab049.
108. Tsuda, M., Ogawa, S., Ooka, M., Kobayashi, K., Hirota, K., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Chikuma, S., Sasanuma, H., Debatisse, M., Doherty, A. J., Fuchs, R. P., and Takeda, S. (2019) PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching, *PLoS One*, **14**, e0213383, doi: 10.1371/journal.pone.0213383.
 109. Taylor, M. R. G., and Yeeles, J. T. P. (2018) The initial response of a eukaryotic replisome to DNA damage, *Mol. Cell*, **70**, 1067-1080, doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.022.
 110. Lyu, K., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (2019) RPA-coated single-stranded DNA promotes the ETAA1-dependent activation of ATR, *Cell Cycle*, **18**, 898-913, doi: 10.1080/15384101.2019.1598728.
 111. Van, C., Yan, S., Michael, W. M., Waga, S., and Cimprich, K. A. (2010) Continued primer synthesis at stalled replication forks contributes to checkpoint activation, *J. Cell Biol.*, **189**, 233-246, doi: 10.1083/jcb.200909105.
 112. Vallerger, M. B., Mansilla, S. F., Federico, M. B., Bertolin, A. P., and Gottifredi, V. (2015) Rad51 recombinase prevents Mre11 nuclease-dependent degradation and excessive PrimPol-mediated elongation of nascent DNA after UV irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 6624-6633, doi: 10.1073/pnas.1508543112.
 113. Bai, G., Kermi, C., Stoy, H., Schiltz, C. J., Bacal, J., Zaino, A. M., Hadden, M. K., Eichman, B. F., Lopes, M., and Cimprich, K. A. (2020) HLTf promotes fork reversal, limiting replication stress resistance and preventing multiple mechanisms of unrestrained DNA synthesis, *Mol. Cell*, **78**, 1237-1251.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.031.
 114. Kang, Z., Fu, P., Alcivar, A. L., Fu, H., Redon, C., Foo, T. K., Zuo, Y., Ye, C., Baxley, R., Madireddy, A., Buisson, R., Bielinsky, A., Zou, L., Shen, Z., Aladjem, M. I., and Xia, B. (2021) BRCA2 associates with MCM10 to suppress PRIMPOL-mediated repriming and single-stranded gap formation after DNA damage, *Nat. Commun.*, **12**, 5966, doi: 10.1038/s41467-021-26227-6.
 115. Couch, F. B., Bansbach, C. E., Driscoll, R., Luzwick, J. W., Glick, G. G., Bétous, R., Carroll, C. M., Jung, S. Y., Qin, J., Cimprich, K. A., and Cortez, D. (2013) ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse, *Genes Dev.*, **27**, 1610-1623, doi: 10.1101/gad.214080.113.
 116. Berti, M., Chaudhuri, A. R., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., Marino, F., Lucic, B., Biasin, V., Gstaiger, M., Aebersold, R., Sidorova, J. M., Monnat, R. J., Jr., Lopes, M., and Vindigni, A. (2013) Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 347-354, doi: 10.1038/nsmb.2501.
 117. Giansanti, C., Manzini, V., Dickmanns, A., Dickmanns, A., Palumbieri, M. D., Sanchi, A., Kienle, S. M., Rieth, S., Scheffner, M., Lopes, M., and Döbelstein, M. (2022) MDM2 binds and ubiquitinates PARP1 to enhance DNA replication fork progression, *Cell Rep.*, **39**, 110879, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110879.
 118. Geno, M. M., Gagné, J. P., Yasuhara, T., Jackson, J., Saxena, S., Langelier, M. F., Ahel, I., Bedford, M. T., Pascal, J. M., Vindigni, A., Poirier, G. G., and Zou, L. (2021) CARM1 regulates replication fork speed and stress response by stimulating PARP1, *Mol. Cell*, **81**, 784-800.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.010.
 119. Leuzzi, G., Marabitti, V., Pichierri, P., and Franchitto, A. (2016) WRNIP 1 protects stalled forks from degradation and promotes fork restart after replication stress, *EMBO J.*, **35**, 1437-1451, doi: 10.15252/embj.201593265.
 120. Tagliatela, A., Leuzzi, G., Sannino, V., Cuella-Martin, R., Huang, J. W., Wu-Baer, F., Baer, R., Costanzo, V., and Ciccia, A. (2021) REV1-Polζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps, *Mol. Cell*, **81**, 4008-4025.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.016.
 121. Li, J., and Zhang, Q. (2015) Primpol mutation: functional study does not always reveal the truth, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 1181-1182, doi: 10.1167/iovs.14-16072.
 122. Yuan, H., Wang, Q., Li, Y., Cheng, S., Liu, J., and Liu, Y. (2020) Concurrent pathogenic variants in SLC6A1/NOTCH1/PRIMPOL genes in a Chinese patient with myoclonic-atonic epilepsy, mild aortic valve stenosis and high myopia, *BMC Med. Genet.*, **21**, 93, doi: 10.1186/s12881-020-01035-9.
 123. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., Van Den Berk, P. C. M., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734-4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
 124. Díaz-Talavera, A., Montero-Conde, C., Leandro-García, L. J., and Robledo, M. (2022) PrimPol: a breakthrough among DNA replication enzymes and a potential new target for cancer therapy, *Biomolecules*, **12**, 248, doi: 10.3390/biom12020248.

REGULATION OF HUMAN DNA PRIMASE-POLYMERASE PrimPol

Review

E. O. Boldinova^{1,2*} and A. V. Makarova^{1,2}¹ *Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”,
123182 Moscow, Russia; e-mail: lizaboldinova@yandex.ru*² *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Transmission of genetic information depends on successful completion of DNA replication. Genomic DNA is subjected to damage on a daily basis. DNA lesions create obstacles for DNA polymerases and can lead to replication blockage, DNA break formation, cell cycle disruption and apoptosis. Cells have adapted to DNA damage evolving mechanisms allowing to eliminate lesions prior to DNA replication (DNA repair) and mechanisms which help to bypass lesions during DNA synthesis (DNA damage tolerance). The second group of pathways includes the mechanism of DNA synthesis restart at the damaged sites by DNA primase-polymerase PrimPol. Human PrimPol was first described in 2013. The properties and functions of PrimPol have been extensively studied in recent years, but very little is known about the regulation of PrimPol and the association of the enzyme dysfunction with diseases. The present review is devoted to an analysis of the mechanisms of human PrimPol regulation in the context of DNA replication. The interaction of PrimPol with other proteins is discussed in detail and an attempt is made to compile a possible pathway for the regulation of human PrimPol activity. The paper also addresses the relationship of PrimPol dysfunction with human diseases.

Keywords: primase-polymerase PrimPol, DNA synthesis restart, replication, DNA damage