

# 跨损伤合成的 DNA 聚合酶

## ——一类新的 DNA 聚合酶\*

陈建明 余应年\*\*

(浙江大学医学院病理生理学教研室, 杭州 310031)

**摘要** 细胞虽然拥有多种修复途径, 但有些 DNA 损伤仍不可避免地会逃避修复而在基因组上保留下来, 细胞跨损伤 DNA 合成的分子机制一直是 DNA 修复中主要的未解决问题之一. 最近通过对一类结构相关性 UmuC/DinB 蛋白质超家族成员的研究发现它们具有 DNA 聚合酶功能. 这类新发现的 DNA 聚合酶不同于经典的复制性 DNA 聚合酶, 它们能以易误/突变 (error-prone/mutagenic) 或无误 (error-free) 方式进行跨损伤 (translesion) DNA 合成, 并且从细菌到人在进化上功能保守.

**关键词** DNA 聚合酶, DNA 损伤, 无误性跨损伤合成, 易误性跨损伤合成, DNA 修复

**学科分类号** Q591.3, Q559

细胞在各种内外环境化学物不断攻击下通常会发生 DNA 损伤, 损伤导致 DNA 复制受阻, 这时, 人们惯常考虑到细胞周期检查点 (checkpoint), 认为细胞分裂周期会在检查点处停顿下来, 使细胞能有足够的时间来修复任何类型 DNA 损伤, 以便 DNA 复制及细胞分裂能继续进行. 但最近发现情况并不完全如此, DNA 损伤并不总是被除去, 当损伤负荷 (lesion burden) 超过细胞修复机制所能承受的能力或损伤本身不能被其修复途径识别、修复时, 一些 DNA 损伤会在基因组上暂时保留下来, 而带有大量未修复损伤的细胞照样能进行 DNA 复制及分裂, 那么细胞是如何耐受其 DNA 损伤的<sup>[1,2]</sup>?

最近发现一类跨损伤合成 (损伤旁路, damage bypass) 的 DNA 聚合酶回答了这个问题. 这类新发现的 DNA 聚合酶不同于经典的复制性 DNA 聚合酶, 它们能以无误或易误方式将核苷酸插入到模板 DNA 损伤部位对应的新生链上而跨越损伤, 使 DNA 复制受阻恢复、细胞周期继续. 原核生物、酵母及人体细胞中发现都存在跨损伤合成的 DNA 聚合酶. 序列对比揭示这类跨损伤合成的 DNA 聚合酶共同拥有 4 个高度保守的基序 (基序 I ~ IV), 它们同属于一结构相关性 UmuC/DinB 蛋白质超家族成员. 序列对比还揭示在基序 I ~ IV 之外另存在亚家族特异性保守基序, 该蛋白质超家族进一步又可分成四个亚家族, 分别是 *E. coli* UmuC-、*E. coli* DinB-、*S. cerevisiae* RevI- 及 *S. cerevisiae* Rad30- 样蛋白质亚家族. UmuC- 样蛋白目前仅发现

于细菌中, DinB- 样蛋白在原核及真核生物中皆已被发现, 而 RevI- 及 Rad30- 样蛋白目前只发现于真核生物体内. DNA 损伤旁路的分子机制长期以来一直是 DNA 代谢中一个悬而未决的问题, 最近展开的对 UmuC/DinB 蛋白质超家族成员的系列研究有助于揭示这类损伤旁路途径的分子机制<sup>[3~7]</sup>.

## 1 原核生物中跨损伤合成的 DNA 聚合酶

### 1.1 DNA 聚合酶 IV

早在 1980 年就已发现 *dinB* 基因是 SOS 调控下的一个损伤诱导基因, 但直到最近关于 *dinB* 基因功能所知甚少. 人们只知道 *dinB* 基因在  $\lambda$  噬菌体感染 UV 照射过的 *E. coli* 宿主后发生的非定标性突变 (nontargeted mutagenesis) (即突变并不是特异地位于碱基损伤处或其附近) 过程中起作用, 并且发现 *dinB* 基因突变株在诱发 SOS 反应后会导致随后感染的病毒突变率下降, 而外源性 *dinB* 基因的过表达则会导致 *E. coli* 体内附加型 (episomal) F' lac 质粒上非定标性突变率的明显升高 (直至升高上千倍), 且这类非定标性突变通常为移码突变, 引起同聚序列 (homopolymeric runs) 上缺失 1 个核苷酸. *dinB* 基因的这种可引发非定标性突变功能不依赖于 *recA* 或 *umuC/D* 基因, 由此, 人们推测 *dinB* 基因可能在 *E. coli* 的自发性突变

\* 国家自然科学基金重点资助项目 (39830210).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0571-7217149, E-mail: ynyu@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2000-03-13, 接受日期: 2000-05-15

(spontaneous mutagenesis) 中起作用<sup>[3-5, 8]</sup>. 最近 Wagner 等<sup>[9]</sup>的研究结果支持 *dinB* 基因的这一作用, 他们发现纯化的 DinB 蛋白具有内在 DNA 聚合酶活性, 将其命名为 *E. coli* DNA 聚合酶 IV (Pol IV). DNA 聚合酶 IV 缺乏 3' → 5' 校读外切核酸酶活性, 能以严格分布方式 (strictly distributive manner) 延伸鼓出的 (bulged) 引物/模板结构, 错配的引物/模板 (如 G-G 错配) 能形成一滑移中间体 (slipped intermediate), 引起正常复制机器停顿并从上解离下来, 这时的滑移中间体可依靠 DinB 蛋白的聚合酶活性进行特异性延伸, 结果复制产物就要比正常的缺少 1 个核苷酸. 氨基酸定点 (site-directed) 突变试验发现 DinB 蛋白突变能使其自身的 DNA 聚合酶活性失活, 并同时导致其所拥有的可引发 *E. coli* 中 F' lac 质粒发生非定标性突变的功能丧失, 可见 DinB 蛋白的致突变功能与其 DNA 聚合酶活性相关. 由于非定标性突变的形成源于真正的错配或不配碱基, DNA 聚合酶 IV 可能是细菌在各种代谢应激条件下引发全基因组范围突变的主要候选酶. DNA 聚合酶 IV 可否跨越其他类型损伤有待于进一步研究<sup>[3-5, 8, 9]</sup>.

## 1.2 DNA 聚合酶 V

已知 *E. coli* 中大部分的跨损伤合成依赖于损伤诱导的 UmuD'2C 异源二聚体. *umu* 类基因失活突变株不同于野生型菌株, 在接触各种致突变物后并不表现为突变率的显著升高, 可见 Umu 依赖性跨损伤合成过程通常是易误性的. UmuD2 只有当发生了 RecA 介导的分子内水解反应, 形成活性形式的 UmuD'2 蛋白后才具备促跨损伤合成的能力<sup>[3, 10]</sup>. 关于细菌中 UmuD'2C 依赖性跨损伤合成的确切机制曾有过多种猜测. 最初认为可能是 UmuD'2C 修改了 *E. coli* 某一种 DNA 聚合酶的活性而使其能跨越损伤; 后来又认为跨损伤合成时复制性 DNA 聚合酶 III 全酶在损伤部位停顿下来, UmuD'2C 结合到损伤处包被了 RecA\* (RecA 蛋白的激活形式) 的 DNA 纤丝顶端后, 与停顿在该处的 DNA 聚合酶 III 全酶接触, DNA 聚合酶 III 插入 1 个核苷酸到对应于模板损伤处的新生链 3' 端后, 在 UmuD'2C 的驱动 (shepherding) 下跨越损伤. 最近, Tang 等发现 UmuD'2C 具有 DNA 聚合酶活性, 是一个易误性 DNA 聚合酶, 命名为 DNA 聚合酶 V (Pol V). 当有 RecA、β-滑动夹 (β-sliding clamp)、γ-夹装载复合体 (γ-clamp loading complex) 及单链结合蛋白 (SSB) 存在时, DNA

聚合酶 V 的活性在损伤及未损伤模板位置皆表现为高度易误. 研究发现 DNA 聚合酶 V 能有效跨越模板无碱基位置 (abasic site), 其效率要比 DNA 聚合酶 III 全酶的高 100 到 150 倍, 并遵循 “A-规则”, 优先插入 dAMP 到模板无碱基位置的对应部位上. 考虑到 UmuC 与 *E. coli* DNA 聚合酶 IV 及 *S. cerevisiae* DNA 聚合酶 η 在结构上相似, DNA 聚合酶 V 的活性位置很可能位于 UmuC 上, UmuD'2 则可能是该酶的一个促进亚基, 事实上, DNA 聚合酶 V 以全酶形式存在时活性最强. DNA 聚合酶 V 如何催化跨损伤合成目前还不清楚, 推测在损伤处单链 DNA 与 RecA\* 形成一核酸蛋白 (nucleoprotein) 纤丝, RecA\* 纤丝可能是 DNA 聚合酶 V 的唯一底物, 在 RecA\* 存在下 DNA 聚合酶 V 拷贝损伤 DNA 模板, 当缺口 (gap) 填充完成以后, RecA\* 纤丝消失, 新链又通过 DNA 聚合酶 III 而延伸<sup>[3-5, 8, 10-12]</sup>.

## 2 真核生物中跨损伤合成的 DNA 聚合酶

### 2.1 DNA 聚合酶 ζ 及其人同源物

芽生酵母 *S. cerevisiae* 中, 已知 *RAD6* 上位群 (epistasis group) 基因参与损伤 DNA 的复制后修复 (postreplication repair, PRR), *RAD6* 基因群介导的复制后修复其实质就是复制后的跨损伤合成, 包括三个独立的旁路, 二个是无误性的而另一个则是易误性的. 现已发现 *RAD6* 上位群中的 *REV1*、*REV3* 和 *REV7* 等基因参与易误性跨损伤合成旁路, 其中的 Rev3 和 Rev7 蛋白结合一起形成具跨损伤合成能力的 DNA 聚合酶 ζ (Pol ζ). DNA 聚合酶 ζ 催化的跨损伤合成过程还需要有 Rev1 蛋白参与. Rev1 蛋白氨基端序列与 *E. coli* UmuC 及 DinB 蛋白同源. Rev1 蛋白具有 DNA 模板指导的 dCMP 转移酶活性, 能催化 dCMP 专一性插入到模板无碱基位置的对应部位上. Rev3 和 Rev7 蛋白组成的 DNA 聚合酶 ζ 是一易误性 DNA 聚合酶, 其中的 Rev3 为催化亚基, Rev3 蛋白与 DNA 聚合酶 α、δ 及 ε 属同一家族, 酵母 *REV3* 基因缺失并不致死, 可见它并非是必需基因, 其作用可能仅限于跨损伤合成; Rev7 是该酶的一个辅助因子, 起增强 Rev3 蛋白稳定性及其跨损伤合成效率的作用. DNA 聚合酶 ζ 能跨越胸腺嘧啶二聚体及其他类型的 DNA 损伤. 酵母中模板无碱基位置的跨损伤合成是通过 DNA 聚合酶 ζ 及 Rev1 转移酶两者协同作用完成的, Rev1 蛋白先在模板无碱基

位置的对应部位上插入 1 个 C 残基而后 DNA 聚合酶  $\zeta$  才能进行有效延伸。体外试验发现 Rev1 不影响 DNA 聚合酶  $\zeta$  跨越胸腺嘧啶二聚体的能力, 缺乏 Rev1 蛋白时, DNA 聚合酶  $\zeta$  照样能通过插入错误碱基有效跨越模板上的胸腺嘧啶二聚体<sup>[2-6, 13, 14]</sup>。酵母 *REV3* 人同源基因 *hREV3* 也已被克隆, *hREV3* 基因定位于染色体 1p32-33, 蛋白质序列对比表明该基因的编码产物是人 DNA 聚合酶  $\zeta$  的催化亚基, 与其酵母同源基因相类似, *hREV3* 基因参与人体细胞内的易误性跨损伤合成旁路<sup>[15]</sup>。

## 2.2 DNA 聚合酶 $\eta$ 及其人同源物

芽生酵母中, *RAD6* 上位群中的 *RAD5* 和 *RAD30* 基因分别在两个变通的无误性跨损伤合成旁路中起作用。已知 Rad30 蛋白与细菌 DinB、UmuC 及酵母 Rev1 蛋白同源。最近, Johnson 等发现 *RAD30* 基因编码产物是一个具跨损伤合成能力的 DNA 聚合酶, 命名为 DNA 聚合酶  $\eta$  (Pol $\eta$ )。与 Rev 蛋白所催化的易误性跨损伤合成不同, DNA 聚合酶  $\eta$  通过在胸腺嘧啶二聚体的对应部位上插入两个 A 残基而以无误方式有效跨越模板胸腺嘧啶二聚体。Washington 等研究指出 DNA 聚合酶  $\eta$  是一个低保真度、低持续合成能力 DNA 聚合酶, 在插入核苷酸时该酶可出现  $10^{-2}$  到  $10^{-3}$  的差错率, 这种低保真度特性反映了该酶具有灵活多样的活性位置, 以使它较经典复制性 DNA 聚合酶更能耐受模板 DNA 损伤; 而该酶的低持续合成能力则有助于限制它的酶活性以减少错误的发生。DNA 聚合酶  $\eta$  的活性受 Rad6-Rad18 复合体的调控, Rad6-Rad18 复合体的作用可能是靶向 DNA 聚合酶  $\eta$  到模板损伤部位, 使 DNA 聚合酶  $\eta$  的作用仅限于损伤旁路, 很可能 DNA 聚合酶  $\eta$  跨越损伤后立即由 DNA 聚合酶  $\delta$  接手而延伸。目前, 关于 DNA 聚合酶  $\eta$  是否能精确跨越其他类型 DNA 损伤还未见报道, 很可能它在跨越其他类型损伤时是易误的<sup>[3-7, 16-18]</sup>。最近, 通过对着色性干皮病变体 (xeroderma pigmentosum variant, XP-V) 的研究发现人体细胞中也存在 DNA 聚合酶  $\eta$ <sup>[19-21]</sup>。

## 3 着色性干皮病变体与人 DNA 聚合酶 $\eta$ 之间的关系

着色性干皮病变体患者易患阳光诱发的皮肤癌, UV 可诱发 XP-V 细胞发生高突变, 且其突变谱不同于正常细胞。XP-V 细胞核苷酸切除修复功

能正常但复制后修复缺陷, 它不能通过插入 2 个 A 残基而跨越模板上 UV 诱导的胸腺嘧啶二聚体。上述这些已知特点及最近发现酵母 Rad30/DNA 聚合酶  $\eta$  能忠实跨越胸腺嘧啶二聚体的特性促使研究人员推测, 可能是 Rad30 人同源物 (homologue) 缺陷导致了 XP-V 病。最近, 两个研究小组几乎同时证实了这种推测。Masutani 等发现来自 HeLa 细胞的一种蛋白质能恢复 XP-V 细胞提取物跨损伤合成活性, 并发现这一 XP-V 校正蛋白具有 DNA 聚合酶活性, 能精确插入 dATP 到模板胸腺嘧啶二聚体的对应部位上。Masutani 等进一步发现这一 XP-V 校正蛋白与酵母 Rad30 蛋白同源, 其 DNA 聚合酶活性就是人 DNA 聚合酶  $\eta$ , 他们分析了 5 个 XP-V 细胞系发现在人 DNA 聚合酶  $\eta$  基因上都携带有突变, 并发现重组人 DNA 聚合酶  $\eta$  能校正 XP-V 细胞提取物跨越胸腺嘧啶二聚体缺陷, 由此他们得出人 DNA 聚合酶  $\eta$  就是 *XPV* 基因产物。Johnson 等也独立克隆了酵母 *RAD30* 人同源基因 *hRAD30A*, 他们发现 XP-V 细胞系中 *hRAD30A* 基因会发生无义或移码突变, 是 *hRAD30A* 基因缺陷导致了 XP-V 病, 并且认为 hRad30A/人 DNA 聚合酶  $\eta$  催化的无误性跨损伤合成在降低阳光诱发皮肤癌的发生率上起重要作用。XP-V 病人体内 DNA 聚合酶  $\eta$  功能完全缺陷, 可见 *hRAD30A* 基因并非为生存或生长所必需。XP-V 病人 DNA 聚合酶  $\eta$  催化的无误性跨损伤合成旁路缺陷可能导致 UV- 诱导的损伤进入 DNA 聚合酶  $\zeta$  催化的易误性旁途径, 引起病人细胞高发突变并导致皮肤癌发生率升高<sup>[1, 3-7, 16, 19-22]</sup>。

McDonald 等最近克隆了酵母 *RAD30* 的第二个人同源基因, 命名为 *hRAD30B*。 *hRAD30B* 基因定位于染色体 18q21.1, 这一区域在许多肿瘤中常常发生缺失, 但 *hRAD30B* 基因与肿瘤发生之间的关系目前还不清楚。 *hRAD30B* 基因与许多修复蛋白质一样在人睾丸中高表达。尽管 XP-V 病人中 *hRAD30B* 基因没有突变, 但考虑到其编码产物与其他跨损伤合成 DNA 聚合酶相似, 很可能该基因编码产物是另外一种新的人 DNA 聚合酶<sup>[3, 23]</sup>。 *dinB* 基因人同源基因 *hDINB1* 最近也被克隆, *hDINB1* 基因定位于染色体 5q13.1, 该基因也同样在人睾丸中高表达。 hDinB1 蛋白氨基酸序列与细菌 DinB 蛋白的高度同源, 很可能它也是人的一种新 DNA 聚合酶<sup>[3, 4, 24]</sup>。 *hRAD30A*、*hRAD30B* 及 *hDINB1* 等基因之间的功能相关性还不清楚, 可

能它们各自用于跨越特异类型的 DNA 损伤, 例如 hRad30A/人 DNA 聚合酶  $\eta$  尽管能跨越胸腺嘧啶二聚体, 但却不能跨越 (6-4) 嘧啶-嘧啶二聚体, 可见跨损伤活性某种程度上可能是损伤特异性的<sup>[3]</sup>.

综上所述, 上述蛋白质所具备的 DNA 聚合酶活性揭开了了一类新的损伤旁路机制, 但也引出了一系列问题. 例如, 这些 DNA 聚合酶是如何偶联到复制机器上的? 它们是以独立形式起作用的, 还是作为多亚基蛋白复合体的一部分? DNA 聚合酶  $\eta$  能跨越哪些类型 DNA 损伤? 它是否以无误方式跨越某些类型损伤而又以易误方式跨越另外一些类型损伤? 细胞为什么要同时拥有无误及易误损伤旁路途径, 两者如何调控? *hRAD30B* 及 *hDINB1* 基因到底起什么作用? 它们是否参与无误或易误损伤旁路途径等等<sup>[1, 3~5, 7]</sup>?

### 参 考 文 献

- Wood R D. Variants on a theme. *Nature*, 1999, **399** (6737): 639~ 640
- Baynton K, Bresson-Roy A, Fuchs R P P. Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (2): 960~ 966
- Woodgate R. A plethora of lesion replicating DNA polymerases. *Genes & Development*, 1999, **13** (17): 2191~ 2195
- Johnson R E, Washington M T, Prakash S, *et al.* Bridging the gap: A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (22): 12224~ 12226
- Friedberg E C, Gerlach V L. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell*, 1999, **98** (4): 413~ 416
- Lindahl T, Wood R D. Quality control by DNA repair. *Science*, 1999, **286** (5446): 1897~ 1905
- Cleaver J E. Stopping DNA replication in its tracks. *Science*, 1999, **285** (5425): 212~ 213
- Radman M. Enzymes of evolutionary change. *Nature*, 1999, **401** (6756): 866~ 869
- Wagner J, Gruz P, Kim S R, *et al.* The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell*, 1999, **4** (2): 281~ 286
- Tang M, Shen X, Frank E G, *et al.* UmuD<sub>2</sub>C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (16): 8919~ 8924
- Reuven N B, Arad G, Maor-Shoshani A, *et al.* The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem*, 1999, **274** (45): 31763~ 31766
- Sutton M D, Opperman T, Walker G C. The *Escherichia coli* SOS mutagenesis proteins UmuD and UmuD' interact physically with the replicative DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (22): 12373~ 12378
- Nelson J R, Lawrence C W, Hinkle D C. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, 1996, **272** (5268): 1646~ 1649
- Nelson J R, Lawrence C W, Hinkle D C. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature*, 1996, **382** (6593): 729~ 731
- Gibbs P E M, Mcgregor W G, Maher V M, *et al.* A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase zeta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (12): 6876~ 6880
- Johnson R E, Prakash S, Prakash L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol $\eta$ . *Science*, 1999, **283** (5404): 1001~ 1004
- Johnson R E, Prakash S, Prakash L. Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *J Biol Chem*, 1999, **274** (23): 15975~ 15977
- Washington M T, Johnson R E, Prakash S, *et al.* Fidelity and processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase  $\eta$ . *J Biol Chem*, 1999, **274** (52): 36835~ 36838
- Masutani C, Araki M, Yamada A, *et al.* Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *The EMBO J*, 1999, **18** (12): 3491~ 3501
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, *et al.* The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase  $\eta$ . *Nature*, 1999, **399** (6737): 700~ 704
- Johnson R E, Kondratiek C M, Prakash S, *et al.* *hRAD30* mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science*, 1999, **285** (5425): 263~ 265
- Mcgregor W G, Wei D, Maher V M, *et al.* Abnormal, error-prone bypass of photoproducts by xeroderma pigmentosum variant cell extracts results in extreme strand bias for the kinds of mutations induced by UV light. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (1): 147~ 154
- McDonald J P, Rapic-Otrin V, Epstein J A, *et al.* Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, 1999, **60** (1): 20~ 30
- Gerlach V, 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~ 11927

## Translesion Synthesis DNA Polymerase: A Novel DNA Polymerase<sup>\*</sup>

CHEN Jiar-Ming, YU Ying-Nian<sup>\*\*</sup>

(Department of pathophysiology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract** although there are many repair pathways in cells, some lesions still escape repair inevitably and remain in genome. In cells, the molecular mechanism of translesion DNA synthesis has been one of the major unsolved problems in DNA repair for a long time. Recently, it was found that the members of a structurally related UmuC/DinB protein superfamily have DNA polymerase function. Unlike the classical replicative DNA polymerases, these newly identified DNA polymerases can carry out translesion DNA synthesis in both error-prone/ mutagenic and/or error-free ways. It was also found that their functions are conserved from bacteria to human.

**Key words** DNA polymerase, DNA damage, error-free translesion synthesis, error-prone translesion synthesis, DNA repair

---

<sup>\*</sup> This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China for Key Program (39830210).

<sup>\*\*</sup> Corresponding author. Tel: 86-571-7217149, E-mail: ynyu@mail.hz.zj.cn

Received: March 13, 2000 Accepted: May 15, 2000