

[illegible]

執行期間：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

共同主持人：

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 91 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

配對錯誤與單股未配對核酸修復系統之交一互作用

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2320-B-002-109

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：方偉宏 國立台灣大學醫學院醫事技術學系

計畫參與人員：李淑貞，莊以光，張友婷台大醫技系碩士班

一、中文摘要

大腸桿菌核酸配對錯誤甲基指引修復系統是以 MutH、MutL、MutS 為主的十種酵素，針對核酸配對錯誤進行修復，以確保複製及基因重組時之忠誠度而維持基因之穩定性。修復反應一開始，包含配對錯誤所引發在未甲基化之一股上進行切割造成斷股，斷股之位置可以發生在未甲基化這一股上單一配對錯誤之 3' 或 5' 端，如此以利進行修復。我們曾證明這套修復系統除了可以修復單一鹼基配對錯誤外，尚可修復大至 7 個鹼基嵌入及刪除之未配對寡核酸環，但是對於較大核酸環的修復效率則非常的低。在不同的生物體中，包括人類，也找到了相似的修復機制與鹼基嵌入及刪除之修復特異性。在試管中之修復結果指出，人類細胞對於較大之未配對核酸環異雙股核酸存在一套與核酸配對錯誤修復機制不同之修復系統。由於到目前為止，尚未顯示出一套特別之修復系統針對大腸桿菌之多鹼基核酸環進行修復，因此曾有推測多鹼基單股核酸環或許會藉由修復附近之配對錯誤而被共同修復之。

為了驗證此想法，我們擬建構了一系列半甲基化之異雙股核酸，在這些基質上同時包含單一配對錯誤與 21 個未配對鹼基的單股核酸，以及單一配對錯誤位於 21 個鹼基核酸環之上游若干鹼基處。這些異雙股核酸在試管中與大腸桿菌之細胞萃取物進行修復後，再分析其修復效率。

在這個研究中，我們發現了異雙股核酸上的單股核酸環可以經由一個股斷而被修復，而且其修復不需要 *mutH*、*mutL*、*mutS* 等基因產物之參與。不僅如此，在 *mutH*、*mutL*、*mutS* 突變株中，原本不能修復的核酸配對錯誤也可以經由這個單股核酸環的

修復而被共同修復。這個修復必須存在一個股斷才能發生，而且核酸環及單股未配對核酸必須在股斷的同邊。

本實驗顯示大腸桿菌中有多重修復的系統以確保遺傳的恒定。

關鍵詞：核酸環修復，核酸配對錯誤修復，共同修復

Abstract

The *Escherichia coli* methyl-directed, MutHLS-dependent mismatch repair system controls genetic variability by correcting DNA biosynthetic errors and ensuring the fidelity of homologous genetic recombination. Initiation of repair involves the mismatch-provoked incision of the unmodified strand at a hemimethylated d(GATC) sequences. The resulting strand break, which can occur either 3' or 5' to the mismatch on the unmethylated strand, suffices to target correct on to this strand. This system can repair base-base mispair as well as to correct insertion or deletion heterologies up to about 7 unpaired nucleotides, but larger heterologies are poorly processed by this system. Similar repair pathways and broad insertion or deletion mispairs specificity have been found in a variety of organisms, including in human. *In vitro* experiments have also suggested that human cells possess a system distinct from the mismatch repair pathway for processing heteroduplex with large insertion/deletion heterologies. Since the results described to date suggested that there was no multibase loop specific repair system in *E. coli*, it's interesting for us to know whether a mismatch in the vicinity of a loop could

provoke the repair of both heterologies (corepair phenomenon).

To test this idea, we constructed series of f1MR1-PM hemimethylated heteroduplex substrates containing both single base mismatch and 21 unpaired bases. The single base mismatch locates 43 bases upstream to the 21-base-loop. Repair efficiency of these substrates are determined by using an *in vitro* assay. The repair strand specificity of the methylation state and the dependent on products of *mutH*, *mutL*, *mutS*, and *uvrD* loci were tested. We found a loop repair activity is independent of methyl-directed system. Using mismatch repair deficient cell extracts, we found single base mismatch was co-repaired by a loop repair activity. In order to understand whether the distance would affect the corepair efficiency, the large nucleotides heterologies designed in different distance from the mispair base. We found co-repair can cover several hundred nucleotides section.

The results of this project highlight the important and versatility of the DNA loop repair systems in its ability not only to repair loops and but also indirectly to base-base mismatch through corepair activity.

Key words: DNA loop repair, Base-base mismatch repair, co-repair

二、緣由與目的

大腸桿菌之甲基指引核酸配對錯誤修復系統，在矯正核酸複製時所產生的錯誤以及確保基因重組時之忠誠度上扮演著極為重要的角色⁽¹⁾。以細胞萃取物中(*in vitro*)，針對不同之基質(substrate)所引發之甲基指引修復反應，已經在試管中使用純化之蛋白質而重現反應⁽²⁾。參與整個修復過程中之成員包含大腸桿菌之 MutH、MutL、MutS、DNA helicase II (*uvrD* 基因產物)、單股核酸鍵結蛋白(single strand DNA binding protein; SSB)、核酸聚合酶(DNA polymerase III)、核酸接合酶(*E. coli* ligase)、和核酸外切酶(DNA exonuclease)即 ExoI、ExoVII 或 RecJ 三者其中之一⁽²⁾。因此以甲基指引之方式移除配對錯誤之核酸的整個作用機制，已經被清楚地證實^(1,3)。

基本上，這套修復系統主要針對核酸複製後(post-replication)所造成的鹼基配對錯誤而進行修復⁽²⁾，因為當大腸桿菌核酸複製後，新合成的一股其 d(GATC) 序列有一短暫時間尚未被 *dam* methylase 甲基化⁽⁴⁾，因此大腸桿菌甲基指引修復系統在此半甲基化狀態之核酸上，藉由原始模版(parental strand)之甲基化狀態而指引修復發生在新合成核酸上的配對錯誤⁽⁵⁾。此外，大腸桿菌這套核酸配對錯誤修復系統，針對所有鹼基配對錯誤之認識能力以及修復效率皆不同⁽⁶⁾。一般而言，G-T 配對錯誤被修復之效率最佳，其他之配對情形 A-C、C-T、A-A、T-T、G-G 和 A-G 則各有不同之修復效率，而 C-C 則幾乎不被修復^(2,6)。

發生配對錯誤時，首先由 MutS 蛋白結合到核酸配對錯誤處⁽⁷⁾啟始修復反應，然後在 ATP 之參與下，吸引 MutL 蛋白與之結合⁽⁸⁾，這樣所形成的複合物便可以活化 MutH 蛋白之核酸內切酶活性(DNA endonuclease)，於未甲基化之一股的 d(GATC) 序列處切開而形成單股斷裂(nick)⁽⁹⁾。此外，MutS 與 MutL 蛋白也會幫助 MutH 蛋白，在核酸上尋找離配對錯誤處最近之未甲基化序列，然後再進行水解作用⁽¹⁰⁾，所以經由水解作用所形成的單股斷裂可以發生在配對錯誤處之 3'端或 5'端⁽¹⁰⁾。在進行移除反應(excision)時，仍然需要 MutS、MutL、DNA helicase II、再加上適當之外切酶(DNA exonuclease)共同參與⁽³⁾。當未甲基化序列位於配對錯誤之 3'端時，由 exonuclease I 執行 3'端往 5'端之核酸移除工作；而未甲基化序列若位於配對錯誤之 5'端時，則由 exonuclease VII 或 RecJ 來執行 5'端往 3'端之核酸移除工作⁽³⁾，因此整個移除反應是發生在未甲基化這一股上。當移除反應結束後，再由核酸聚合酶(DNA polymerase III)，以甲基化這一股作為模版，重新合成被移除之部分，最後再經由核酸接合酶(DNA ligase)之接合作用(ligation)將斷股接合，使核酸回復原本之雙股螺旋結構。因此，當大腸桿菌之甲基指引修復系統發生缺陷時很容易造成突變，因為在 MutH、MutL、MutS 和 UvrD 修復蛋白之基因有缺陷之突變菌種中，最容易觀察到轉變突變(transiton mutation)和骨架

位移突變(frame shift mutation)之現象發生⁽¹¹⁾，因而我們相信大腸桿菌這套核酸配對錯誤修復系統除了修復鹼基配對錯誤外，對於因嵌入(insertion)或刪除(deletion)所造成之未配對鹼基的寡核酸環應該具有修復能力。曾有報告指出，以人工合成之寡核酸環異雙股核酸，經轉殖(transform)至大腸桿菌中，再分析其修復情形，發現含不同數目之未配對鹼基之寡核酸環異雙股核酸，於活體中會有不同之修復效率⁽¹²⁾；在試管中，我們曾利用大腸桿菌之細胞萃取液進行相同之實驗也可以看到一樣之結果⁽¹³⁾，也就是含 1~7 個未配對鹼基之單股寡核酸環，可以有效地經由甲基指引修復系統而進行修復，並且修復之效率也不受寡核酸環之組成所影響⁽¹³⁾。

核酸配對錯誤修復系統，隨著演化的進行被保留了下來，在哺乳動物中，如人類，也有找到大腸桿菌之 MutS 與 MutL 的同源物，分別簡稱為 *hMSH* (Human MutS Homolog)與 *hMLH* (Human MutL Homolog)⁽¹⁴⁾，而其中之各別組成和酵母菌大致相同，例如 *hMutSβ* 由 *hMSH2* 與 *hMSH3* 所構成⁽¹⁵⁾；針對不同配對錯誤之辨識能力和酵母菌也是相類似^(15,16)，並且在功能上也是重複的⁽¹⁷⁾。已經有報告指出，當 *hMSH2* 或一些 *hMLH* (*hMLH1*、*hPMS1*、*hPMS2*) 之基因發生突變時，便會造成遺傳性非息肉性大腸癌 (Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC)^(18,19)，並且伴隨著微衛星標誌(microsatellite)不穩定之現象發生^(20~24)，而在酵母菌中，當這些修復蛋白發生突變時，也是容易出現微衛星增加或減少 1 個甚至 1 個以上的重複單位(repeat unit)之現象⁽²⁵⁾。然而，當 *hMSH6* 基因發生突變時，在活體中並不會觀察到微衛星不穩定之現象發生，其原因在於細胞仍然具有正常之 *hMSH3* 蛋白可以執行修復之功能，但是這樣的突變細胞，對於產生癌症之機率仍然是相當的高⁽²⁶⁾。因此，在真核生物中，人類之核酸配對錯誤修復系統，對於維持遺傳物質之穩定度或避免癌症之產生皆扮演著極為重要的角色。在哺乳動物中，這一套核酸配對錯誤修復系統之機制，基本上和大腸桿菌相當的類似，也是可以從配對錯誤處之 5'端或 3'端開始執行

修復之工作⁽²⁷⁾，但不同的是，在細菌中是藉由甲基化指引(methyl-directed)之方式而修復配對錯誤處；在哺乳動物中，則是經由斷股來指引(nick-directed)著修復蛋白進行配對錯誤之修復⁽²⁸⁾。而這一套核酸配對錯誤修復系統對於各種單一配對錯誤和未配對鹼基之寡核酸環之修復效率也不同，就單一配對錯誤而言，一般來說，嘌呤-嘌呤(purine-purine)和嘌呤-嘧啶(purine-pyrimidine)之配對錯誤所引發之修復效率較好；而嘧啶-嘧啶(pyrimidine-pyrimidine)之配對錯誤修復則較弱，尤其是 C-C 配對錯誤⁽²⁸⁾。對於 1~5 個嵌入/刪除之未配對鹼基環也具有和嘌呤-嘌呤，嘌呤-嘧啶之配對錯誤相同的修復效率，而至於核酸環之修復上限則介於 8~12 個鹼基⁽²⁹⁾，但是對於較大之核酸環仍然不具修復之能力⁽²⁹⁾。在近期有報告指出，較大之核酸環在人類細胞萃取液中，是經由 5'端之斷股而指引修復，但是整個修復之機制，似乎和人類核酸配對錯誤修復系統無關⁽³⁰⁾。這樣的結果引起我們相當的注意，因為在之前本實驗室對於大腸桿菌的研究中發現，甲基指引修復系統對於大至 20 幾個鹼基之核酸環，也是不具任何修復能力⁽¹³⁾，因此，我們所感到興趣的是，在大腸桿菌中是否存在任何機制來處理因嵌入或刪除所造成之大核酸環的修復問題。核酸在進行基因重組時(genetic recombination)，會先形成所謂的 Holliday junction⁽³¹⁾，然後將相同之兩股進行互換(strand ex-change)，在這過程中，如果所互換之兩股在序列上並非完全同源(homeogenous)，則可能會同時形成鹼基配對錯誤與核酸環。在酵母菌的研究中發現，當進行基因重組過程中所產生的這些配對錯誤與核酸環若未被修復，則會抑制下次基因重組之進行⁽³²⁾。所以，在生物體內勢必存在一套修復系統以維持基因重組之穩定性。在大腸桿菌中，我們已知甲基指引修復系統會對鹼基配對錯誤與少數寡核酸環進行修復⁽¹³⁾，然而，是否這一套系統會藉由修復基因重組時所產生之配對錯誤而間接地修復了附近的核酸環。較早期之研究發現，參與大腸桿菌之基因互換(gene conversion)所造成配對錯誤之修復，是經由甲基化指引共同修復(corepair)而完

成的⁽³³⁾。此外，也有人設計不同大小之核酸環異雙股核酸，然後在活體中(*in vivo*)進行實驗而證實，在大腸桿菌中對於大至 514 個鹼基之核酸環，可以藉由修復附近之配對錯誤而共同修復之，並且與甲基指引系統有關⁽³⁴⁾。

為了解甲基指引共同修復之專一性、機制與反應需求，我們計畫設計一系列半甲基化異雙股核酸，而在此異雙股核酸上同時包含了各種配對錯誤 (GG, GT, GA, AA, AC, CT, TT, CC 等) 與 21 個鹼基之單股核酸環，然後在試管中與大腸桿菌細胞萃取物一起反應，以研究是否存在此共同修復之機制。此外，在核酸環與鹼基配對錯誤之距離考量上，大部分之異雙股核酸上的核酸環與配對錯誤相距約 43 個鹼基；我們也將設計了一種異雙股核酸，其核酸環與配對錯誤相距長達 243 個鹼基。以探討修復反應的範圍。探討的項目包括：共同修復的現象是否與配對錯誤的修復專一性有直接的關聯；共同修復與兩者間的距離遠近是否有關；共同修復是否也與甲基指引之股專一性；共同修復是否需要 *mutH*、*mutL*、*mutS* 和 *uvrD* 等基因產物之參與等。

三、結果與討論

為了證明核酸配對錯誤與單股核酸環是否能被大腸菌細胞萃取液所共同修復，我們設計了含有一個各種配對錯誤及單股核酸環的雜雙股核酸 (如表一)，以此雜雙股核酸進行試管中反應，我們發現只要存在有股缺刻的存在，就會有一個修復活性將單股核酸環修復，而且這個活性與甲基指引修復活性無關，而缺刻的位置可以出現在 5' 端或是 3' 端。如果提供的雜雙股核酸為完整連續的核酸環，則修復的效率則大大的降低。

我們以甲基指引缺乏的大腸菌萃取液進行測試，發現在單股核酸環附近的核酸配對錯誤可以被共同修復，這個修復的活性只要是配對錯誤與單股核酸環出現在股斷的同一邊即可發生。

由以上的結果結論出在大腸桿菌中，針對核酸複製或是核酸重組時所產生的錯誤，有一種以上的修復系統可以對不同規

模的錯誤進行修復，這種修復的重疊性是確保生物體遺傳物質穩定的重要手段。

表一、*mutS* 大腸菌萃取液共同修復反應
修復反應中含 24fmol 反應物，修復結果以 fmol 表示。

錯誤種類 I	錯誤種類 II	修復 I	修復 II
cccGG		<0.5	
cccCC		<0.5	
	C32		4.65
	V32		5.52
CC	C32	6.0	6
GT	C32	6.7	6.8
TT	C32	4.2	4.7
AA	C32	4.9	4.4
AC	C32	4.1	5.3
GA	C32	4.6	4.0
GG	C32	5.6	5.7
GG	V32	4.4	4.4
C21	CC	6.7	7.4
C21	GT	2.3	2.9
C21	TT	6.4	6.8
C21	AA	5.7	5.4
C21	AC	3.7	4.1
C21	GA	4.6	4.4
C21	CT	5.1	5.5
V21	TG	4.2	4.3

四、計畫成果自評

本研究成功完成原計畫申請書中的目標。
本研究正準備投稿中。

五、參考文獻

參考文獻

1. Modrich, P.: Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 25:229-253, 1991.
2. Lahue, R. S., Au, K. G., and Modrich, P.: DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245:160-164, 1989.
3. Grilley, M., Griffith, J., and Modrich, P.: Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 268:11830-11837, 1993.
4. Lyons, S. M. and Schendel, P. F.: Kinetics of methylation in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 159:421-423, 1984.
5. Lu, A. L., Clark, S. and Modrich, P.: Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4639-4643, 1983.

6. Su, S. S., Lahue, R. S., Au, K. G., and Modrich, P.: Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro. *J. Biol. Chem.* 263:6829-6835, 1988.
7. Su, S. S. and Modrich, P.: *Escherichia coli* *mutS*-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 83:5057-5061, 1986.
8. Grilley, M., Welsh, K. M., Su, S. S., and Modrich, P.: Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *mutL* gene product. *J. Biol. Chem.* 264:1000-1004, 1989.
9. Au, K. G., Welsh, K. and Modrich, P.: Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 267: 12142-12148, 1992.
10. Cooper, D. L., Lahue, R. S. and Modrich, P.: Methyl-directed mis-match repair is bidirectional. *J. Biol. Chem.* 268:11823-11829, 1993
11. Claverys, J. P. L., SA.: Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol. Rev.* 50:133-165, 1986..
12. Dohet, C., Wagner, R. and Radman, M.: Methyl-directed repair of frameshift mutations in heteroduplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3395-3397, 1986.
13. Fang, W. H. , Wu, J. Y. and Su., M. J.: Methyl-directed repair of mismatched small heterologous sequences in cell extracts from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272:22714-22720, 1997.
14. Fishel, R. and Wilson, T.: MutS homologs in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development.* 7:105-113, 1997.
15. Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R. and Fishel, R.: hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13629-13634, 1996.
16. Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T. and Jiricny, J.: hMutS β , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr. Biol.* 6:1181-1184, 1996.
17. Umar, A., Risinger, J. I., Glaab, W. E., Tindall, K. R., Barrett, J. C. and Kunkel, T. A.: Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* 148:1637-1646, 1998.
18. Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Lynch, H. T., Watson, P., Jass, J. R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomaki, P., Chapelle, A., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.: Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature medicine* 2:169-172, 1996.
19. Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., et al. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263:1625-1629, 1994.
20. Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., and Perucho, M.: Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat. Genet.* 6:273-281, 1994.
21. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561, 1993.
22. Thibodeau, S. N., Bren, G., and Schaid, D.: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-819, 1993.
23. Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B., and Nordenskjold, M.: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat. Genet.* 5:279-282, 1993.
24. Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J. and Hamilton, S. R., et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816, 1993.
25. Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., and Petes, T. D.: Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276, 1993.
26. Edelmann, W., Yang, K., Umar, A., Heyer, J., Lau, K., Fan, K., Liedtke, W., Cohen, P. E., Kane, M. F., et al: Mutation in the mismatch repair gene *Msh6* causes cancer susceptibility. *Cell* 91:467-477, 1997.
27. Fang, W. H. and Modrich, P.: Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J. Biol. Chem.* 268:11838-11844, 1993.
28. Modrich, P.: Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272:24727-24730, 1997.
29. Umar, A., Boyer, J. C., and Kunkel, T. A.: DNA loop repair by human cell extracts. *Science* 266:814-816, 1994.
30. Littman, S. J., Fang, W. H. and Modrich, P.: Repair of large insertion deletion heterologies in human nuclear extracts is directed by a 5' single-strand break and is independent of the mismatch repair system. *J. Biol. Chem.* 274:7474-7481, 1999.
31. Holliday, R.: A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic Research* 5:282-304, 1964.
32. Manivasakam, P., Rosenberg, S. M. and Hastings, P. J.: Poorly repaired mismatches in heteroduplex DNA are hyper-recombinagenic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142:407-416, 1996.
33. Fishel, R. A., Siegel, E. C., and Kolodner, R.: Gene conversion in *Escherichia coli*. Resolution of heteroallelic mismatched nucleotides by co-repair. *J. Mol. Biol.* 188:147-157, 1986.
34. Carraway, M. and Marinus, M. G.: Repair of heteroduplex DNA molecules with multibase loops in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:3972-3980, 1993.