

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

酵母菌核酸配對錯誤修復之試管中研究 In vitro study of DNA mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*

計畫編號：NSC 87-2314-B-002-287

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：方偉宏 台大醫學院醫事技術學系

一、中文摘要

鹼基配對錯誤可能發生於不全同核酸基因重組過程而且也可能出現在核酸複製的過程中，修復這類錯誤的核酸對於維持基因的恒常性，與避免突變是非常的重要。某些人類疾病，例如遺傳性大腸癌及其它若干癌症，已被證明與核酸配對錯誤修復機能的缺乏有關；而經過人類核酸配對錯誤修復蛋白的基因分析後，發現與酵母菌的核酸配對錯誤修復基因的同質性很高。本計畫以噬菌體 M13mp18 建立一套試管中實驗，設計各種錯誤配對的雜雙股核酸，用來界定修復活性所需要的因子及系統的專一性，測定酵母菌核酸配對錯誤修復系統，我們在酵母菌的萃取液中，觀察到核酸配對錯誤修復的活性，唯修復的活性不高，而且不同批的萃取液中活性不一致，因此需要進一步的研究確認。

關鍵詞：核酸修復，真核細胞，鹼基配對錯誤，核酸複製錯誤，酵母菌

Abstract

DNA base-base mismatches can be generated in several genetic activities. During recombination between related but non-homologous DNA and biosynthetic errors that arise during replication are potential sources of producing mismatched bases. Correction of such DNA transaction errors is essential for maintaining the integrity of the genome.

Mismatch repair had been studied extensively in *Escherichia coli*. Eukaryotic cells also possess mismatch repair activities that are crucial in genetic stabilization. The

importance of this function was dramatically illustrated by the recent demonstration that inactivation of the human pathway confers a strong predisposition to tumor development. It also found human genes of mismatch repair enzymes share great homology to those yeast genes.

Study of mismatch repair with yeast cell extracts may provide insights into the molecular basis for mutagenic phenomenon in some human tumor development. We developed an in vitro mismatch repair assay for yeast system by constructing series of mismatched heteroduplexes to characterize the repair event in yeast cell-free extracts. A mismatch repair activity was detected in yeast. However, the activity was relative low, and each batch of extracts shown different activities. Further analysis are required.

Keywords: DNA Repair, Base-base mismatch, DNA Replication error, *Saccharomyces cerevisiae*

二、緣由與目的

在核酸複製的過程中，由於核酸聚合酶的錯誤，有可能出現鹼基配對錯誤。在基因重組(recombination)的過程中，形成雜雙股核酸(heteroduplex)是一個重要的步驟，其引介兩條雙股核酸進行核酸鍊的交換，這時如果交換中的核酸不全然相同，則鹼基配對錯誤(base-base mismatch)就可能形成於雜雙股中(Lichten and Fox, 1984)，修復這類的錯誤一直被認為與基因還原(gene conversion)等遺傳現象有關。而這些錯誤的修復與維持基因的恒常性息息相關(review, Radman, 1986; Modrich, 1989, 1995)。

近年來若干遺傳性大腸癌與其它偶發性癌症，經過分子生物學研究之後，發現與異常的核酸複製有關，特別是疾病細胞產生重覆核苷序列多樣化 (short tandem repeat polymorphism) 的病例，如遺傳性非多息肉直腸癌 (Hereditary Non-polyposis Colon Cancer, HNPCC) 病人的腫瘤中，也發現微衛星核酸有重覆雙核苷序列小量增長變短的現象 (Aaltonen et al., 1993; Thibodeau et al., 1993; Wooster, 1994)。

目前我們對重覆核酸序列的增長、變短多樣化突變現象的分子基礎並不清楚，推測可能是因為核酸本身的結構易於滑動，使得核酸在複製的過程中產生插入或刪減的情形，(Kunkel, 1993)。正常的細胞在進行核酸複製時，一旦發生核酸插入或刪減，細胞內的修復系統會將其認出而予以修復，若是修復機能無法發揮功能，則很容易產生核酸多樣化的情形 (Kunkel, 1993)，在 HNPCC 的病例中，的確發現自病人所分離的癌細胞，參與核酸配對錯誤修復的基因產生突變 (Fisher et al., 1993)，而癌細胞所發展出來的組織培養也缺乏試管中核酸配對錯誤修復能力 (Parsons et al., 1993)。

核酸配對錯誤修復系統中，被研究得最透徹的要算是大腸菌中的甲基指引核酸配對錯誤修復系統 (Methyl-directed mismatch repair)，這個系統是一項核酸複製後的除錯修復機制 (Review, Modrich, 1989, 1991, 1996)，其修復過程牽涉到修復蛋白 MutS 識別錯配的位置，再加上 MutL 蛋白共同活化內切酶 MutH，這些蛋白的共同作用下可以在尚未甲基化的新生核酸 (GATC) 序列上，產生一個與配對錯誤相關的股裂 (nick)，接下來由外切核酸酶將含有錯誤配對的核酸水解，最後再由複製用核酸聚合酶合成正確的核酸以完成修復的工作。

核酸配對錯誤修復系統中的基因在演化上很保守，酵母菌中的 MSH2 及人類的 hMSH2 與大腸菌中識別配對錯誤的蛋白質 MutS 同質 (homologous)。而酵母的 MLH1，

PMS1 與人類的 hMLH1, hPMS1 及 hPMS2 與 MutL 蛋白同質 (Fishe1, 1995)。若干研究也顯示細菌與高等生物在配對錯誤修復的功能上也相似，例如範圍寬廣的受質識別能力：細菌可修復 C-C 以外的七種鹼基配對錯誤及 1 到 4 個的核酸插入或刪除，而人類系統可以修復所有的配對錯誤及小段插入刪除 (Modrich, 1996)。

比起原核生物，在真核生物核酸配對錯誤修復系統的生化研究顯得比較緩慢，根據上述核酸配對錯誤修復蛋白的核酸序列同質分析 (DNA sequence homology analysis)，真核細胞間像是人類和酵母菌的同質蛋白質的相似性，要超過人類和原核細胞如大腸菌的相似性。而且在真核細胞中，MutS 及 MutL 的同質體，都是以異雙體 (heterodimer) 的狀態進行其功能，這一點與細菌的 MutS 及 MutL 有所差異。本計劃希望運用過去研究人體細胞核酸配對錯誤修復系統的經驗，製作一套配對錯誤的雜雙股核酸，以探討酵母菌在試管中對核酸配對錯誤修復的能力。本項研究在雜雙股核酸中的一股提供一個股裂 (nick) (Fang, 1993)，將會使其容易被修復，我們根據這一點進行探討。

在進行人類細胞研究之前，酵母菌核酸修復的研究將可建立一個經濟的實驗模式，配合研究酵母菌核酸修復的機制，發展出成熟的材料及方法之後，可能提供深入檢視一些人類傳傳疾病的分子基礎。

三、結果與討論

我們對噬菌體 M13mp18 進行特定位置的突變，製作了一系列的突變種噬菌體如表一。

製作 M13mm 系列的突變種是以合成的 27 寡核苷酸取代 M13mp18 在 *Pst*I and *Kpn*I 兩個限制酵素位置間的位置，我們分別以：

v5' CGACGTT CAGTCATGCA (AGT) CTAG (AC) TGCA

c3' CATGGCTGCAAGTCAGTACGT (TCA) GATC (TG)

產生 mm1, mm2, mm3, 及 mm4，另以

表一、製作噬菌體突變種

M13mm 突變株是設計來製作配對錯誤的雜雙股核酸，以下為突變的核酸序列，顯示新設計的限製酵素位置，V:噬菌體股；C:對應股。

突變種	核酸序列	限製酶
M13mm1	V5'- ATGCAT CTAGT v C3'- TACGT AGATCA c	<i>NsiI</i>
M13mm2	V5'-ATGCA ACTAGT v C3'-TACG TTGATCA c	<i>SpeI</i>
M13mm3	V5'- ATGCAT CTAGC v C3'- TACGT AGATCG c	<i>NsiI</i>
M13mm4	V5'-ATGCAG CTAGC v C3'-TACGT CGATCG c	<i>NheI</i>
M13mm5	V5'- GTGCAC CTAGC C3'- CACGT GGATCG	<i>ApaI</i>
M13mm6	V5'-GTGCAG CTAGC C3'-CACGT CGATCG	<i>NheI</i>
M13mm7	V5'- GTGCAC CTAGA C3'- CACGT GGATCT	<i>ApaI</i>
M13mm8	V5'-GTGCAT CTAGA C3'-CACGT AGATCT	<i>XbaI</i>

v5' CGACGTTCAAGTCGTGCA (CGT)CTAG (AC)TGCA

c3' CATGGCTGCAAGTCAGCACGT (GCA)GATC (TG)

製作 mm5, mm6, mm7, and mm8. 寡核苷酸中括弧部分採用多重設計，以便一次取得多種突變株。

我們成功的製成八種突變株後，再以這一系列的變種噬菌體兩兩配對合成八種異雙股核酸(Lu et al.1983)，如表二。

我們先以這些雜雙股核酸，以大腸桿的萃取液進行分析，發現大腸菌的萃取液具有修復這些雜雙股核酸的能力，而其修復的專一性及強度與先前的報告相仿(Lahue et al, 1989)。

接著我們分別以酵素法、超音波法及玻璃砂法(Chang et al 1991; Muster-Nassal,

表二、雜雙股核酸受質

將M13mm 突變種做適當的配對，就可以做出八種可能的配對錯誤雜雙股核酸，如表一所示，寡核苷酸的取代產生新的唯一限制酶 *ApaI*, *NheI*, *NsiI*, *SpeI*, 或 *XbaI* 的位置，當我們用一個突變種的噬菌體股核酸配上另一個突變種的對應股產生雜雙股，經過反應後就可以用這些限制酶來監測雜雙股中的那一股被修復了，底線標示了限制 的位置。

Heteroduplex	Phages	Restriction Markers
v 5'-ATGCA ACTAGT	M13mm2	<i>SpeI</i>
c 3'-TACGT AGATCA	M13mm1	<i>NsiI</i>
v 5'- ATGCAT CTAGT	M13mm1	<i>NsiI</i>
c 3'-TACGT TTGATCA	M13mm2	<i>SpeI</i>
v 5'-ATGCAG CTAGC	M13mm4	<i>NheI</i>
c 3'-TACGT AGATCG	M13mm3	<i>NsiI</i>
v 5'- ATGCAT CTAGC	M13mm3	<i>NsiI</i>
c 3'-TACGT CGATCG	M13mm4	<i>NheI</i>
v 5'-GTGCAG CTAGC	M13mm6	<i>ApaI</i>
c 3'-CACGT GGATCG	M13mm5	<i>NheI</i>
v 5'-GTGC AC CTAGC	M13mm5	<i>NheI</i>
c 3'-CACGT CGATCG	M13mm6	<i>ApaI</i>
v 5'-GTGCAT CTAGA	M13mm8	<i>XbaI</i>
c 3'-CACGT GGATCT	M13mm7	<i>ApaI</i>
v 5'-GTGC AC CTAGA	M13mm7	<i>ApaI</i>
c 3'-CACGT AGATCT	M13mm8	<i>XbaI</i>

1986)進行酵母菌萃取液的製備，結果我們只有兩批以玻璃砂法的萃取液製備中，得到核酸修復的活性，而且這兩次所得到的活性專一性並不相同，一批是對 G-T 雜雙股核酸有 20%的修復能力，另一批則是專對單股未配對環的修復能力。

本研究面臨到的問題，是無法得到可靠的酵母菌萃取液，這個部分仍在嘗試解決。

如果能夠在試管中有效的分析修復活

性，將有助於進一步的純化參與反應的酵素及鑑定其特定的功能。這項使用酵母菌作材料的研究，應會比細菌的研究更為接近人類的修復系統，就未來而言將有助於我們對核酸代謝疾病的致病機轉有更進一步的了解。

四、計畫成果自評

本研究的前半部在設計雜雙股核酸的部分與原計畫完全相符、達成預期目標，但是在製作酵母菌萃取液的部分則遇到問題，仍需要時間克服，目前所設計的雜雙股核酸，適於進行不同物種的核酸修復研究，目前已提供國內的研究者進行 MutY 修復系統的研究。尤於尚無具體成果，本研究尚不適合在學術期刊發表。

五、參考文獻

- Aaltonen, L. A., Peltomäki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260 812-816.
- Chang D-Y and A-L Lu (1991) Base mismatch-specific endonuclease activity in extracts from *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4761-4766.
- Fang, W.-H., Modrich, P. (1993). Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J. Biol. Chem.*, 268 11838-11844
- Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75 1027-1038.
- Fisher, R. and Kolodner R. D. (1995) Identification of mismatch repair gene and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 5:382-395.
- Kunkel, T. A. (1993). Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature*. 365 207-208.
- Lahue, R. S., Au, K. G., Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science*. 245 160-164.
- Lichten, M., Fox, M. S. (1984). Evidence for inclusion of regions of nonhomology in heteroduplex products of bacteriophage lambda recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81 7180-7184.
- Lu, A. L., Clark, S., Modrich, P. (1983). Methyl-directed repair of DNA basepair mismatches in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80 4639-4643.
- Muster-Nassal C, Kolodner R: Mismatch correction catalyzed by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc natl Acad Sci USA* 1986, 83:7618-7622.
- Modrich, P. (1989). Methyl-directed DNA mismatch correction. *J. Biol. Chem.*, 264 6597-6600.
- Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, 25 229-253.
- Modrich, P. (1995). Mismatch repair, genetic stability and tumour avoidance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 347 89-95.
- Modrich, P. and R. Lahue (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 101-133
- Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W.-H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Modrich, P. (1993). Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. 75 1227-1236.
- Radman, M., Wagner, R. (1986). Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 20 523-538.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260 816-819.
- Wooster, R., Cleton-Jansen, A. M., Collins, N., Mangion, J., Cornelis, R. S., Cooper, C. S., Gusterson, B. A., Ponder, B. A., von Deimling, A., Wiestler, O. D. et al. (1994). Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat. Genet.*, 6 152-156.