

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 酵母菌核酸單股未配對核酸修復之試管中研究

### In vitro study of single-stranded DNA loop repair in *Saccharomyces cerevisiae*

計畫編號：NSC 88-2314-B-002-233

執行期限：87年8月1日至88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

本研究使用一系列的大腸菌噬菌體 M13mp18 核酸雜雙股核酸，分別含有 1 至 8 以及 2 2 個未配對的單股核酸，在試管中測試酵母菌中的核酸修復系統進行修復的分析，這些在雜雙股核酸中的未配對鹼基被設計在兩個限制酶的識別序列上，讓我們可以分別的測定各股核酸中的修復情形。我們的結果顯示，酵母菌的萃取液對於修復核酸配對錯誤與小量核酸增減效果並不明顯。

由於人類細胞核酸配對錯誤修復的缺陷，與遺傳性大腸癌及其它癌症有關，我們將測定方法進一步修改成人類細胞修復的測定，結果發現在人類中的修復具有股專一性，這個專一性與股斷的存在與否有關，修復活性的強弱與單股核酸環的大小無一定的相關。

**關鍵詞：**核酸修復，單股未配對核酸，核酸複製錯誤，核酸配對錯誤修復

#### Abstract

Unpaired single-stranded DNA can arise in ectopic recombination between related but non-allelic DNA sequence, their repair is thought to contribute the phenomenon of gene conversion. Unpair single strands can also be generated during DNA replication, especially in lagging strand slipped DNA synthesis. Repair of such heterology is important for maintaining genome integrity. Several human genetic diseases have been shown repetitive-sequence instability of affected gene. Defects in single-stranded loop

repair may be relevant to such phenomenon. Study of single-strand loop 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 repair activity was detected in yeast. However, the activity was relative low, and each batch of extracts shown different activities.

We modified the in vitro assay for human cell study. The repair of 12-, 27-, 62-, and 216-nucleotide unpaired heterologies has been demonstrated in nuclear extracts of human cells. The presence of a single-strand break 5' to the heterology greatly increases the efficiency of rectification and directs repair to the incised DNA strand. The repair by this system requires ATP and the four dNTPs and is inhibited by aphidicolin. Repair is independent of the mismatch repair proteins MSH2, MSH6, MLH1, and PMS2 and occurs by a mechanism that is distinct from that of the conventional mismatch repair system.

**Keywords:** DNA Repair, single-strand loop, DNA Replication error, *Saccharomyces cerevisiae*, Human cell

#### 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，有可能出現單股未配對核酸。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相同，則單股未配對核酸可能會伴隨著鹼基配對錯誤形成於雜雙股中(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甘序列多樣化(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甘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(Fishel, 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。

我們原先認為以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，以發展出成熟材料及方法，然而我們發現酵母菌系統並不穩定，乃與 Modrich (Duke University) 的實驗室合作，直接以人類細胞進行研究。

### 三、結果與討論

我們對噬菌體 M13mp18 進行特定位置

表一. M13LR 雜雙股核酸

含有配對錯誤或是小量核酸環的環狀核酸，是以一系列的突變種噬菌體核酸配成，雜雙股核酸以 C 或 V 表示互補股或病毒股帶有未配對核酸，而數字則是未配對核酸數。

DNA	Heteroduplex site (loop on complementary strand)	M13	Markers
GT	5'-CCTCGAGAGCTTG -v 3'-GGAGCTTTCGAAC -c	LR1 LR3	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>
C1	5'-CCTCG AGCTTG -v 3'-GGAGCTTTCGAAC -c	LR12 LR5	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>
C2	5'-CCTCGA AGCTTG -v 3'-GGAGCTCCTCGAAC -c	LR5 LR7	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>
C3	5'-CCTCGA AGCTTG -v 3'-GGAGCTCCTCGAAC -c	LR5 LR8	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>
C4	5'-CCTCGA GAGCTTG -v 3'-GGAGCTATAGCTCGAAC -c	LR1 LR9	<i>XhoI</i> <i>EcoRV</i>
C5	5'-CCTCGA AGCTTG -v 3'-GGAGCTATAGCTCGAAC -c	LR5 LR9	<i>HindIII</i> <i>EcoRV</i>
C6	5'-CCTCGA GAGCTTG -v 3'-GGAGCTGGTACCCTCGAAC -c	LR1 LR10	<i>XhoI</i> <i>NcoI</i>
C7	5'-CCTCGA AGCTTG -v 3'-GGAGCTGGTACCCTCGAAC -c	LR5 LR10	<i>HindIII</i> <i>NcoI</i>
C8	5'-CCTCGA GCTTG -v 3'-GGAGCTGGTACCCTCGAAC -c	LR12 LR10	<i>XhoI</i> <i>NcoI</i>
C22	5'-_____ -v 3'-TCGTCGTCGTCGGAGCTCTCGA -c	mp18 LR1	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>
DNA	Heteroduplex site (loop on viral strand)	M13	Markers
AC	5'-CCTCGAAAGCTTG -v 3'-GGAGCTCTCGAAC -c	LR3 LR1	<i>HindIII</i> <i>XhoI</i>
V1	5'-CCTCGAGAGCTTG -v 3'-GGAGCT TCGAAC -c	LR1 LR5	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>
V2	5'-CCTCGAGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT TCGAAC -c	LR7 LR5	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>
V3	5'-CCTCGAGGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT TCGAAC -c	LR8 LR5	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>
V4	5'-CCTCGACCATGGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT CCCTCGAAC -c	LR10 LR8	<i>NcoI</i> <i>XhoI</i>
V5	5'-CCTCGATATCGAGCTTG -v 3'-GGAGCT TCGAAC -c	LR9 LR5	<i>EcoRV</i> <i>HindIII</i>
V6	5'-CCTCGACCATGGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT CTCGAAC -c	LR10 LR1	<i>NcoI</i> <i>XhoI</i>
V7	5'-CCTCGACCATGGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT TCGAAC -c	LR10 LR5	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>
V8	5'-CCTCGACCATGGGAGCTTG -v 3'-GGAGCT CGAAC -c	LR10 LR12	<i>NcoI</i> <i>XhoI</i>
V22	5'-AGCTAGCAGCAGCAGCTCGAG -v 3'-_____ -c	LR1 mp18	<i>XhoI</i> <i>HindIII</i>

的突變，之後成功的合成 1-8 及 22 個未配對核酸環的異雙股核酸(Lu et al.1983)如表一。

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 (Fang, 1997)。

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, 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。

計劃期間，我們與 Modrich 的實驗室合作，以 f1 噬菌突變株構建較長的雜雙股核酸，直接對人類細胞進行研究，結果發現人類細胞對於 12-， 27-， 62-，及 216-個未配對核酸環具有修復能力，修復反應需要在未配對核酸的 5' 端具有一個個股斷，同時需要 ATP 及四種 dNTPs，這個修復反應與 MSH2, MSH6, MLH1 及 PMS2 無關。

#### 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。研究期間所設計的雜雙股核酸，已進行於人類細胞核酸修復的研究，已發表於學術期刊。

Susan J. Littman, Woei-horng Fang, Paul Modrich. 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. 1999, 274(11). 7474-7481.

#### 五、參考文獻

- Aaltonen, L. A., Peltomaki, 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, Wu J-Y, Su M-J. Methyl-directed repair of mismatched small heterologous sequences in cell extracts from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1997; 272: 22714-22720.
- 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 Second (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.