

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

單股未配對核酸環修復之遺傳及生化分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-243-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：方偉宏

計畫參與人員：王柏堅、王薔惠、李淑貞、莊以光、張友婷

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 6 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

單股未配對核酸環修復之遺傳及生化分析

Genetic and biochemical analysis of single strand DNA loop repair

計畫編號：NSC 91 —2314—B002—243

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：方偉宏 國立台灣大醫學院醫事技術學系

中文摘要

本計畫以噬菌體 M13mp18 設計各種單股環的雜雙股核酸，包括 8-，12-，16-，22-，27-，45-，及 429-核苷酸的環，建立一套試管中實驗，未配對環被設計在兩個重疊的限制，因此可以獨立測定各股核酸修復的情形。我們的結果顯示在大腸菌萃取液中，一個無論是在 3' 或 5' 端的股斷足以指引在修復在斷股上的核酸環，這個系統的股專一性修復需要 Mg^{2+} 及四種 dNTPs，而且在插入或是刪除的錯配都同樣有效，這個活性與 MutHLS 錯誤修復系統完全不同，而修復的股專一位與 GATC 甲基化的狀態無關，而且不需要 *mutH*，*mutL*，and *mutS* 等基因產物的存在，本研究提供了大腸桿菌中存在了一個與傳統配對錯誤修復完全不同的單股環修復活性。

識

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

The nick-directed DNA repair of a set of M13mp18 derived heteroduplexes containing 8-, 12-, 16-, 22-, 27-, 45-, and 429-nucleotide loops was determined by *in vitro* assay. Unpaired nucleotides of each heteroduplexes reside within overlapping recognition sites for two restriction endonucleases, permitting independent evaluation

of repair occurring on either DNA strand. Our results show that a strand break located either 3' or 5' to the loop is sufficient to direct heterology repair to the nicked strand in *Escherichia coli* extracts. Strand-specific repair by this system requires Mg^{2+} and the four dNTPs and is equally efficient on insertions and deletions. This activity is distinct from MutHLS mismatch repair pathway. Strand specificity and repair efficiencies are largely independent of the GATC methylation state of the DNA and presence of the products of mismatch repair genes *mutH*, *mutL*, and *mutS*. This study provides evidence for a loop repair pathway in *E. coli* that is distinct from conventional mismatch repair.

Keywords: DNA Repair, Base-base mismatch, DNA Replication error, *Escherichia coli*, Nick-directed

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的的蛋白質 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)。

本計劃運用過去研究細胞核酸配對錯誤修復系統的經驗, 製作一套配對錯誤核酸環的雜雙股核酸, 以探討大腸菌在試管中對核酸環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。大腸菌核酸修復的研究將可建立一個經濟的實驗模式, 配合研究大腸菌核酸修復的機制, 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。我們成功的製成十餘種突變株後, 再以這一系列的變種噬菌體兩兩配對合成十餘種異雙股核酸(Lu et al. 1983)。

表一、以噬菌體突變種核酸製備異雙股核酸受質

M13mp18 突變株是設計來製作配對錯誤的雜雙股核酸, 以下為突變噬菌體, V: 噬菌體股; C: 對應股。

DNA	V	
	C	Markers
GT	LR1	<i>XhoI</i>
	LR3	<i>HindIII</i>
C8	LR12	<i>XhoI</i>
	LR10	<i>NcoI</i>
C12	LR8	<i>XhoI</i>
	LR15	<i>EcoRV</i>
V12	LR15	<i>EcoRV</i>
	LR8	<i>XhoI</i>
C16	LR12	<i>XhoI</i>
	LR15	<i>EcoRV</i>

V16	LR15	<i>EcoRV</i>
	LR12	<i>XhoI</i>
C22	mp18	<i>HindIII</i>
	LR1	<i>XhoI</i>
V22	LR1	<i>XhoI</i>
	mp18	<i>HindIII</i>
V27	LR10	<i>XhoI</i>
	mp18	<i>HindIII</i>
C45	mp18	<i>HindIII</i>
	LR2	<i>XhoI</i>
V45	LR2	<i>XhoI</i>
	mp18	<i>HindIII</i>
V429	LR4	<i>NheI</i>
	mp18	<i>HindIII</i>

我們以這些雜雙股核酸，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。

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，而其修復的能力與股斷的存在與否有關，而且以核酸配對錯誤突變種 *mutS* 細胞萃取液測定仍具有修復活性，其專一性及強度如表二。

表 II

Efficiency of loop repair in E. coli extracts

Repair was determined in extracts of RK1517 (*mutS*) and methyl-directed mismatch repair proficient NM522 as described under “Experimental Procedures”. 3’-Circle contained a strand break on the complementary DNA strand at the *EcoRI* site (49 or 70 base pairs 3’ to the heterology). 5’-Circle contained a nick on the C strand at the *BglI* site (146 base pairs 5’ to the heterology). CC-Circle, covalently closed circular heteroduplex DNA. C+, repair occurring on the complementary strand; V-, repair occurring on the viral strand. Repair shown for each DNA strand is the average of at least three measurements ± 1 S.D. Complete repair would correspond to 21 fmol.

	Repair (fmol)			
	RK1517		NM522	
	C+	V-	C+	V-
CC-Circle				
C-22	0.54 $\pm$ 0.33	0.31 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.14
V-22	0.86 $\pm$ 0.23	1.3 $\pm$ 0.17	1.0 $\pm$ 0.27	1.6 $\pm$ 0.32
3’-Circle				
C-8	2.7 $\pm$ 0.23	0.5 $\pm$ 0.19	2.9 $\pm$ 0.20	1.7 $\pm$ 0.28

C-12	6.1 ± 0.68	0.16 ± 0.14	6.0 ± 0.52	0.60 ± 0.13
C-16	8.4 ± 0.13	0.16 ± 0.05	9.8 ± 0.31	0.96 ± 0.36
V-16	5.6 ± 0.24	0.60 ± 0.10	4.6 ± 0.17	0.37 ± 0.16
C-22	2.9 ± 0.73	0.67 ± 0.41	3.0 ± 0.31	1.1 ± 0.06
V-22	5.4 ± 0.37	0.53 ± 0.01	5.3 ± 0.56	0.97 ± 0.04
C-27	9.4 ± 0.69	0.89 ± 0.62	9.7 ± 0.30	1.4 ± 0.45
V-27	5.4 ± 0.25	1.1 ± 0.21	6.0 ± 0.50	2.2 ± 0.18
C-45	5.7 ± 0.70	0.72 ± 0.12	6.2 ± 0.33	3.3 ± 0.32
V-45	4.8 ± 0.12	0.67 ± 0.46	4.8 ± 0.31	4.1 ± 0.23
V-429	6.1 ± 1.0	1.7 ± 0.38	7.6 ± 0.35	2.7 ± 0.38
G-T	0.99 ± 0.30	0.09 ± 0.15	1.7 ± 0.15	5.2 ± 0.31
5'-Circle				
C-8	5.5 ± 0.25	0.73 ± 0.17	6.5 ± 0.79	1.0 ± 0.96
C-12	6.5 ± 1.1	0.27 ± 0.24	6.6 ± 0.48	0.67 ± 0.15
C-16	3.4 ± 0.2	0.38 ± 0.24	3.4 ± 0.23	0.51 ± 0.14
V-16	3.4 ± 0.4	0.46 ± 0.20	4.2 ± 0.26	0.75 ± 0.25
C-22	3.6 ± 0.33	0.24 ± 0.15	4.0 ± 0.25	0.20 ± 0.06
V-22	6.3 ± 0.60	0.41 ± 0.36	7.2 ± 0.63	1.0 ± 0.31
V-27	3.2 ± 0.54	0.90 ± 0.26	3.2 ± 0.25	1.5 ± 0.16
C-45	3.3 ± 0.12	0.77 ± 0.12	3.9 ± 0.25	1.5 ± 0.21
V-45	3.1 ± 0.12	1.1 ± 0.08	3.4 ± 0.12	2.5 ± 0.13
V-429	6.5 ± 0.50	1.7 ± 0.50	7.8 ± 0.60	2.5 ± 0.26
G-T	3.6 ± 0.56	0.48 ± 0.17	4.4 ± 0.35	3.5 ± 0.44

本研究除了表二的測定外，同時也測定了各種核酸配對錯誤變種的細胞萃取液的修復活性，發現無論是 mutL, mutS, mutH 皆可進行股斷指引的修復，因此本系統與上述基因產物皆無關，另測定了甲基化狀態也發現與修復活性無關，而在反應需求上，核酸環的修復不需要 ATP,這一點與配對錯誤修復系統是最主要的差異。

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。這項使用大腸菌作材料的研究，可做為簡便的研究模式，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

本研究的已發表於國際著名學術期刊 Woei-horng Fang, Bo-Jeng Wang, Chiang-Hui Wang, Su-Jan Lee, Yu-Ting Chang Yi-Kuang Chuang, and Chun-Nan Lee. (2003) DNA Loop Repair by Escherichia coli Cell Extracts. J. Biol. Chem. 2003, 278(25) 22446-22452. 本年度另有部分成果正在整理預備發表中。

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., 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). Hypermutable 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.