

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

人類細胞對於核酸配對錯誤與單股未配對核酸環之共同修復機制

Co-repair mechanism of base-base mismatch and single-strand loop by human cell

計畫編號：NSC 92 — 2314—B002—360

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 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

人類核酸配對錯誤修復系統是以 hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1 為主的酵素，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，先由 hMSH2 與 hMSH6 或 hMSH3 的複合體結合上配對錯誤，然後由 hMLH1 及 hPMS1 複合體接上去後開始尋找最近的一個斷股，斷股之位置可以在配對錯誤之 3' 或 5' 端，接著就進行切除及重新合成的修復工作。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 4 個鹼基嵌入及刪除核酸，但是對於較大核酸環則無法修復。我們的另一項研究中，發現人類細胞對於較大之未配對核酸環與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；然而這套系統只能修復在核酸環的 5' 端具有斷股的基質，斷股在 3' 端則無修復活性。因此我們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，我們建構了一系列之異雙股核酸，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人類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 5' 股斷會引發單股核酸環與單一配對錯誤修復的共同修復，而 3' 股斷則造成兩個修復系統的負面干擾，特別是當單股核酸環與單一配對錯誤很接近的時候。

本計畫關鍵詞：人類核酸修復，配對錯誤，單股核酸環，共同修復

Abstract

In human cells, large DNA loop heterologies are repaired through a nick-directed pathway independent of mismatch repair. However, a 3'-nick generated by bacteriophage fd gene II protein heterology is not capable of stimulating loop repair. To evaluate the possibility that a mismatch near a loop could induce both repair types in human cell extracts, we have constructed and tested a set of DNA heteroduplexes each of which contains a combination of mismatches and loops. We demonstrate that a strand break generated by restriction endonucleases, 3' to a large loop, is capable of provoking and directing loop repair. The repair of 3'-heteroduplexes in human cell extracts is very similar to that of 5'-heteroduplex repair, being strand specific and highly biased to the nicked strand. This observation suggests that the loop repair pathway possesses bi-directional repair capability similar to that of the bacterial loop repair system. We also found that a nick 5', to a coincident mismatch and loop, can apparently stimulate the repair of both. In contrast, 3'-nick-directed repair of a G-G mismatch was reduced when in the vicinity a loop (33 or 46 base pair between two sites). Increasing the distance separating the G-G mismatch and the loop by 325 base pairs, restores the efficiency of repair to the level of single base-base mismatch. This observation suggests interference between 3'-nick-directed large loop repair and conventional mismatch repair systems when a mispair is near a loop. We propose a model where DNA repair systems avoid simultaneous repair at adjacent sites to avoid the creation of double stranded DNA breaks.

Keywords : DNA repair, nick-directed, base-base mismatch, single strand loop, co-repair

二、緣由與目的

所有生物在進行遺傳物質的複製及基因重組時，都可能會產生配對錯誤或是插入或刪除單獨未配對核酸的情形，而許多核酸修復系統就是針對可能產生的錯誤進行修復，以確保遺傳的恒定性。這些系統中被研究得最透徹的應該算是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 (DNA polymerase III)、核酸接合 (*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)。

核酸配對錯誤修復系統，隨著演化的進行被保留了下來，在哺乳動物中可找到大腸桿菌之 MutS 與 MutL 的同源物，分別簡稱為 hMSH (Human MutS Homolog)與 hMLH (Human MutL Homolog)⁽⁸⁾，其中 hMutSβ 由 hMSH2 與 hMSH3 所構成⁽⁹⁾；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)^(24, 25)，並且伴隨著微衛星標誌 (microsatellite)不穩定之現象發生。因此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⁽¹²⁾，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⁽¹³⁾。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。對於 1~5 個嵌入/刪除之未配對鹼基環也具有和嘌呤-嘧啶，嘧啶-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⁽¹⁴⁾，但是對於較大之核酸環仍然不具修復之能力⁽¹⁴⁾。

在近期一篇主持人參與的研究指出⁽¹⁵⁾，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。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，也是不具修復能力⁽⁷⁾，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⁽¹⁶⁾，然後將相同之兩股進行互換(strand exchange)，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⁽³⁸⁾。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⁽⁷⁾，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⁽¹⁷⁾。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⁽¹⁸⁾。

在前述人類細胞萃取液對單股未配對核酸環的修復⁽¹⁵⁾，只能經由 5'端之斷股指引修復，如果斷股在 3'端則沒有修復的活性。這個現象頗耐人尋味，似乎這個修復系統只針對特定的生理過程所產生的單股未配對核酸反應，意即核酸複製時的後續股 (lagging strand) 在 Okazaki fragments 上的未配對單股環，才有 5' 的股斷，但是如果在先發股上則只有 3' 的股斷，一旦在上面出現單股未配對核酸環，將會經由那一種機制修正？是否也是經由核酸配對錯誤系統被共同修復之？

為了解單股核酸環是否可以在配對錯誤修復系統修復附近的配對錯誤時，共同被修復，我們設計了一系列異雙股核酸，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，然後在這些錯誤的 5' 或 3' 端分別做出股斷的結構，然後在試管中與人類細胞萃取物一起反應，以研究是否存在此共同修復之機制。

三、結果與討論

我們對噬菌體 flPM 進行特定位置的突變，製作了一系列的突變種噬菌體。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)。

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。以人類細胞的萃取液進行分析，發現萃取液具有修復這些雜雙股核酸的能力，以這些雜雙股核酸進行研究，獲致下列有意義的成果

1. T-G,T-T,C-T,A-A,G-A,G-G,A-C,C-C 8 種可能的配對錯誤，可經由 3'-股斷指引有效的被人類系統修復，且修復效率與 5'-股斷指引相當。

2. C32, V32, C21, C16, V22, C27, V45, V429 等不同大小及位置的單股未配對核酸環可以經由 3'-股斷指引被人類修復系統修復。這個結果與過去的發表的結果相異，推測是過去製作異雙股核酸的方法有問題，以實驗證實的確先前發表的結果不盡確實。

3. 共同存在的單股核酸環及配對錯誤如果靠得很近，而且股斷在 3'位置，則會造成兩個修復系統的相互負面干擾，如果將兩個位置拉開則干擾性形消失。

4. 如果股斷在 5'位置則會造成單股核酸環及配對錯誤正面的共同修復。

5. 在核酸配對錯誤修復缺乏的情形下，單股核酸環修復系統會有效的共同修復相鄰的核酸環及配對錯誤，因此在修復功能上有互補的作用。

我們的研究對於核酸複製及基因重組時可能發生的單股環及配對錯誤共存，可能引發的修復反應機制，提供了新的觀點，有助於我們對核酸代謝機轉有更進一步的了解。

四、計畫成果自評

本研究成效良好，結果已發表於國際著名學術期刊：

Yao-Ming Huang, Shee-Uan Chen, Steven Goodman, Shang-Hsin Wu, Jau-Tsuen Kao, Chun-Nan Lee, Wern-Cherng Cheng, Keh-Sung Tsai, and Woei-horng Fang. (2004) Interaction of Nick-directed DNA Mismatch Repair and Loop Repair in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 30228-30235.

五、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. 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.
8. Fishel, R. and Wilson, T.: MutS homologs in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development.* 7:105-113, 1997.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Modrich, P.: Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272:24727-24730, 1997.
14. Umar, A., Boyer, J. C., and Kunkel, T. A.: DNA loop repair by human cell extracts. *Science* 266:814-816, 1994.
15. 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.
16. Holliday, R.: A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetic Research* 5:282-304, 1964.
17. 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.
18. Carraway, M. and Marinus, M. G.: Repair of heteroduplex DNA molecules with multibase loops in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:3972-3980, 1993.