

· 专论与综述 ·

DNA 聚合酶 Pol ι 的研究进展 *周虎传¹ 杨 劲^{2△}

(1 中国人民解放军三二四医院神经内科 重庆 400020; 2 第三军医大学细胞生物学教研室 重庆 400038)

摘要: Y 家族 DNA 聚合酶是一种跨损伤复制酶, 即能以损伤的 DNA 为模板进行复制。Y 家族 DNA 聚合酶广泛分布生物界, 人类细胞中 Y 家族 DNA 聚合酶至少包括 Rev1、Polk、Pol ι 、Pol η 四种, Pol ι 在以 DNA 为模板进行复制时错配率很高而不同于其他跨损伤 DNA 聚合酶, Pol ι 是目前发现的所有 DNA 聚合酶中保真性最低的 DNA 聚合酶。很高的错配率导致很高的突变率, 最后基因的突变导致癌症的发生, 因此 Pol ι 在各个国家被广泛的研究, 并且对 Pol ι 的各个不同的特性进行了研究, 取得了一系列成果, 现对 Pol ι 的研究进展予以综述, 并展望了未来的研究趋势。

关键词: 跨损伤复制; DNA 聚合酶; Pol ι

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-365-03

Progress in DNA polymerase iota*

ZHOU Hu-chuan¹ YANG Jing^{2△}

(1 Department of Neurology, the Hospital of Third Two Four, Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400020, China;

2 Department of Cytobiology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: Y-family DNA polymerases are one kind of polymerases which replicating damaged template. Y-family DNA polymerases are widely distributed among the three kingdoms of life. Human cells contain at least four: i.e., Rev1 Polk Pol ι and Pol η , and Pol ι is different from the other three DNA polymerases of bypassing damaged template for the rate of mismatching when it replicates DNA is very high. DNA polymerase iota has the lowest fidelity in all of DNA polymerases so far. The high rate of mismatching result in high rate of mutation. Even mismatching was reported to be related to the occurrence of cancer. Therefore the DNA polymerase iota were researched worldwide, for its polymerase from different properties, and gain a series of outcomes. In addition, the prospect of future research is addressed.

Key Words: Bypassing damaged template; DNA Polymerase; Pol ι

Chinese Library Classification (CLC): Q55 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-365-03

前言

细胞 DNA 经常在内源性和外源性 DNA 损伤剂的作用下发生损伤。虽然 DNA 的损伤可以通过核苷酸切除和碱基切除的途径修复, 但许多损伤仍能逃脱修复而对 RNA 聚合酶的转录延伸和 DNA 聚合酶的复制产生阻碍作用, 然而在真核生物中, 属于 Y 家族的 DNA 聚合酶和 B 家族聚合酶之一的 DNA 聚合酶 ζ 可以跨损伤复制 DNA^[1-3]。Y 家族的 DNA 聚合酶包括五大类, 分别 UmuC、DinB、Rev1、Pol η 、Pol ι 。Pol ι 是目前发现的保真性最低的 Y 家族 DNA 聚合酶, 其保真性较高保真 DNA 聚合酶低 1000-10000 倍, DNA 聚合酶 iota 由 pol ι 基因编码, pol ι 基因又称 hRAD30B 基因, 位于 18q21.1, 编码区含有 2147bp。整个基因有 5 个保守模序, 编码产物为 pol ι 蛋白, 即 DNA 聚合酶 I (Pol ι), 是第 9 个真核 DNA 聚合酶, 该蛋白由 715 个氨基酸残基组成。

1 Pol ι 的跨损伤复制

与 Pol η 不同, Pol ι 复制时不能通过 cis_syn TT 二聚体。可是, Pol ι 对脱碱基位点或光反应产物(6-4)TT 的 3'T 可以掺入核苷酸, 但不能执行下一步的延伸步骤^[4-5]。模板为脱碱基位点或光反应产物 (6-4)TT 的 3'T 时, Pol ι 可等同的掺入一个 G、A 或 T, 掺入 C 的几率是最小的。在这两种情况下, 插入核苷酸的模式是与模板为 T 时插入核苷酸的模式是相似的, 因此推测: 可能模板为这些损伤时或未损伤的 T 时, 核苷酸的掺入有着相同的机制。但是, 模板损伤为这两种时, 核苷酸的掺入效率相当低, 可以排除 Pol ι 对这两种损伤的修复有主要的作用。

有证据表明 Pol ι 在旁路损伤修复中扮演一种特定的角色: 当模板为 N2-G 的加合物时, 可以有效的掺入核苷酸^[6-7]。因为 G 的 N2 基团的高反应性, 它可以形成各种内源性加合物。

* 基金项目: 国家自然科学基金(30770460), 中国人民解放军医药卫生科研基金(06H026)

作者简介: 周虎传(1981-)男, 硕士研究生, 电话: (023)68762192 E-mail: zhc120@yahoo.cn

△通讯作者: 杨劲, 电话: (023)68762192 E-mail: yangjingsd@yahoo.cn

(收稿日期: 2010-08-20 接受日期: 2010-09-16)

丙烯醛,一种 α 、 β 不饱和醛,来自体内脂质过氧化反应的终产物和多胺的氧化代谢。G 的 N2 基团与丙烯醛反应,随后与 N1 形成闭环,生成 γ -HOPdG (γ -Hydroxy-1,N(2)-propano-2'-deoxyguanosine: γ -羟基-1,2-丙醇-2'脱氧鸟甘)。既然 γ -HOPdG 主要以闭环的形式存在于核苷酸或单链 DNA[8],预计当它是模板的碱基时,也应以闭环的形式存在。因为闭环的 γ -HOPdG 不能以正常的 Watson-Crick 键配对 C,这个加合物对大多数聚合酶 DNA 的合成有严重的阻碍作用。1,N2-PdG 的结构和闭环的 γ -HOPdG 相似,对 1,N2-PdG 的 NMR 研究表明:在双链 DNA,它采用一种 syn 构象,和 C 形成一种质子化的 Hoogsteen 键^[9]。这一观察暗示:闭环的 γ -HOPdG 和 C 以类似的 Hoogsteen 键结合。模板碱基为 γ -HOPdG 时,Pol α 掺入 C 或 T 的效率是和模板碱基为未损伤的 G 的效率是相同的。随后,Pol α 有效的延伸 C: γ -HOPdG 的末端,但不延伸 T: γ -HOPdG。通过这种损伤的 DNA 修复的有效性和准确性是由 Pol α 和 Pol δ 相继完成的^[10]。

2 Pol α 保真和错配延伸的能力

Pol α 对模板不同碱基掺入核苷酸的效率、保真性是不同的,当模板为嘌呤时,掺入核苷酸的效率和保真性要比模板为嘧啶高许多^[11]。当模板为 A 时,Pol α 显示出其高效和保真性,错配率约为 10^{-3} - 10^{-5} ;模板为 G 时,掺入正确核苷酸的效率比模板为 A 时减少至少 10 倍。当模板为 G 时,它掺入 T 的几率约为 10^{-10} ^[12],当模板为 T 或 C 时,它掺入正确碱基的效率是很低的。模板碱基为 C 时,Pol α 错配核苷酸的几率约为 10^{-1} - 10^{-2} ,而模板为 T 时,其错配 G 的几率是 A 的 10 倍多,错配 T 的几率和 A 相同。

前稳态酶动力学分析表明:模板为碱基 A 时,Pol α 鉴别错配碱基在以下两步,核苷酸结合 (KDdNTP) 和掺入(KPol) (21),Pol α 结合正确核苷酸的亲和力是错配碱基 (G $\Delta\Delta$, 2.2-2.7kcal/mol) 的 40-100 倍,它掺入正确核苷酸是错配核苷酸的 50-300 倍^[12]。(G $\Delta\Delta$ ++, 2.2-3.4kcal/mol),这些自由能的不同暗示:模板碱基为 A 时,Pol α 活性部位的立体空间限制性在核苷酸结合及掺入中对核苷酸的选择起着重要作用。模板碱基为 T 时,Pol α 结合 G 是 A (G $\Delta\Delta$, -1.2kcal/mol) 的 8 倍,结合 T 的亲和力和 A 相同。掺入 A、G、T 的相近 KPol 说明:模板碱基为 T 时,Pol α 在核苷酸的结合及掺入中几乎没有空间选择。模板碱基为 T 时,Pol α 可能结合核苷酸很松,因此酶活性部位的立体空间限制对核苷酸的选择几乎不起作用。

3 Pol α 的结构与 Hoogsteen 键的形成

尽管 Pol α 和 Y 家族其它成员的基本结构相似,有一掌状结构,包含活性位点的酸性残基,催化磷酸二酯键的形成,一个拇指样结构,可以连接 DNA 的小沟,一个手指样结构,可以搁延初始的碱基对,一个 PAD 结构,可以连接(contact)DNA 的大沟^[13],但它显著的与 Pol η 、Pol κ 和 Dpo4 显著不同。

所有已知的 DNA 聚合酶,包括高保真复制/修复聚合酶,还有其它的 Y 家族聚合酶,在正常的 DNA 合成过程中,在它们的活性部位形成 Watson-Crick 键,但 Pol α 合成 DNA 是用 Hoogsteen 键形成碱基对。在 Pol α 的三联体中,模板 A 采用一

种 syn 构象,通过其 Hoogsteen 边缘(N6、N7)和要结合的仍呈 anti(反式)构象的 dTTP 的 Watson-Crick 边缘(N3、O4)形成两个氢键。模板 A 最初因为手指结构域的 Leu62 和 Gln59 被转变为 syn 构象,这引起糖-磷酸骨架结构重建。如果模板 A 在这一结构中呈反式构型,它就会与 Leu62 严重冲突。虽然在与模板 G 和 dCTP 或 dTTP 形成的三联体中 Pol α 的结构仍未确定,但很有可能,Pol α 复制模板碱基也是通过 Hoogsteen 碱基配对。G 的 Hoogsteen 边缘(N7、O6)和 C 的 Watson-Crick 边缘(N3、N4),仍呈反式构象,也形成两个氢键,一个氢键是 G 的 O6 和 C 的 N4,另一个氢键在 G 的 N7 和 C 的 N3 之间。后一个氢键的形成需要 C 的 N3 的质子化。一个几何相似的 Hoogsteen 碱基对可以在 G 和 T 之间由一个氢键形成(G 的 N7 和 T 的 N3)。

Hoogsteen 碱基配对也可作为复制通过嘌呤的小沟加合物的机制,比如那些共价结合到 A 的 N3 或 G 的 N2,因为嘌呤从反式到顺式的旋转使加合物至 DNA 的大沟,那儿只有很少的空间限制。模板为 γ -HOPdG 时,Pol α 容易掺入核苷酸的能力支持这一观点。Hoogsteen 碱基配对还可以提高损伤 Watson-Crick 配对的嘌呤加合物的复制。

但对 Pol α 在 DNA 复制过程中通过 Hoogsteen 键形成碱基配对,也有学者提出质疑。依据 X 线衍射的资料,Nair et al 提出 Pol α 在 DNA 的复制中通过 Hoogsteen 键形成碱基配对^[14]。Wang J.再次审查他们的资料后发现:在模板 dA 的 syn 构型和 dTTP 之间形成的电子密度非常弱,这是适合形成 Watson-Crick 配对,G-C 的碱基对之间在生理 pH 时不可能形成 Hoogsteen 键^[15],因此他认为:Pol α 在 DNA 的复制过程中不太可能通过 Hoogsteen 键形成碱基配对。

4 Pol α 5' 脱氧核糖磷酸裂解酶的活性

人 Pol α 的结构域,有一个 48kDa 的 N 末端域,和抵制酶切作用的 40kDa 核心区域,为蛋氨酸残基 79-蛋氨酸残基 445,通过实验证明 Pol α 40kDa 核心区域与 DNA 共价交联,为 Pol α 脱氧核糖磷酸酶的活性区域。因此,除了具有聚合酶的活性外,Pol α 还有 5' 脱氧核糖磷酸裂解酶的活性,具有该活性的酶还有 pol β 、pol γ 、pol λ ,在重建反应中需要尿嘧啶-DNA 转糖基酶,AP 核酸内切酶,DNA 连接酶,Pol α 可以利用其 5' 脱氧核糖磷酸裂解酶和聚合酶的活性修复 GU、AU 碱基对。这些资料表明 Pol α 可能参与碱基切除修复过程。很有意思的是,与连接其它三种正确的 Watson-Crick 碱基对相比,Pol α 能更有效的连接 dTMP 与模板 A,而且 Pol α 对间隙填补模板 A 碱基有相对高的保真性 2×10^4 ,此与众所周知的 Pol β 相似。由于在 DNA 复制过程中能结合 dUTP,这种属性暗示 Pol α 参与了碱基切除修复^[14]。

5 Pol α 与 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen: 增殖细胞核抗原)的相互作用

Pol α 与 PCNA 的结合方式也和 Fen1 (一个 5'-3' 核酸酶,冈崎片段成熟时去除 RNA)、Apn2(碱基切除修复)不同。在没有 DNA 时,Fen1、Apn2 可以和 PCNA 的 IDCL 结合,当 PCNA 结合到 DNA 底物时,它们还会和 PCNA 的 C 末端结构域相结

合,以增强有效作用。

Poli 及其它 Y 家族成员只与 PCNA 的 IDCL (interdomain connector loop) 作用可能在损伤位点聚合酶的互换起着重要的作用。由于 Pol δ 可与 PCNA 多个位点稳定结合,当复制未损伤的 DNA 时仍结合在 PCNA 上。但当遇到一个 DNA 损伤处时,Pol δ 会停下来,假定激活 Rad6-Rad18 依赖的 PCNA 泛素化^[5],导致 Pol δ 在模板引物连接处的移位。更重要的是因其与 PCNA 多个位点的结合,我们期望 Pol δ 仍与 PCNA 结合。甚至,在 PCNA 164 位赖氨酸残基的泛素化,可能暴露 IDCL 结构域,使 Poli 及其它 Y 家族聚合酶可以靠近 PCNA。然而,Poli 及其它 Y 家族聚合酶只有一个位点结合在锚合在 PCNA 上,它们在旁路损伤修复中发挥作用后即从 DNA 上分离,于是 Pol δ 又可以回到模板引物的连接处。

6 展望

Poli 是目前发现的保真性最低的跨损伤修复酶,在 DNA 跨损伤复制过程中,很有可能导致碱基突变而使基因发生点突变。如果这些突变基因为细胞维持基因稳定的基因,就会导致基因产生级联式的突变,最终导致抑癌基因、细胞生长因子基因等的突变,从而导致肿瘤的发生,因此对 Poli 深入研究有可能为临床研究肿瘤的病因及治疗方案找到突破口。

参考文献(References)

- [1] Bo-Lu Zhou, Janice D. Pata, Thomas A. Steitz. Crystal Structure of a DinB Lesion Bypass DNA Polymerase Catalytic Fragment Reveals a Classic Polymerase Catalytic Domain [J]. J Molecular Cell, 2007, 8 (2):427-437
- [2] Alexandra Vaisman, Kohei Takasawa, Shigenori Iwai. DNA polymerase ϵ -dependent translesion replication of uracil containing cyclobutane pyrimidine dimers [J]. J DNA Repair, 2006, 5(2):210-218
- [3] Alexandra Vaisman, Ekaterina G. Frank, Shigenori Iwai. Sequence context-dependent replication of DNA templates containing UV-induced lesions by human DNA polymerase [J]. J DNA Repair, 2007, 2 (3):991-1006
- [4] Hong Ling, Francis Boudsocq, Roger Woodgate. Crystal Structure of a Y-Family DNA Polymerase in Action: A Mechanism for Error-Prone and Lesion-Bypass Replication [J]. J Cell, 2005, 107:91-102
- [5] M. Todd Washington, Robert E. Johnson, Louise Prakash. Human DNA Polymerase ϵ Utilizes Different Nucleotide Incorporation Mechanisms Dependent upon the Template Base [J]. J Molecular and Cellular Biology, 2004, 8:936-943
- [6] M. Todd Washington, Robert E. Johnson, Louise Prakash. Human DNA Polymerase ϵ Utilizes Different Nucleotide Incorporation Mechanisms Dependent upon the Template Base [J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24:936-943
- [7] Rajendra Prasad, Katarzyna Bebenek, Esther Hou. Localization of the Deoxyribose Phosphate Lyase Active Site in Human DNA Polymerase ϵ by Controlled Proteolysis [J]. J Biological Chemistry, 2003, 278: 29649-29654
- [8] Katerina G. Frank, Jane M. Sayer, Heiko Kroth. Translesion replication of benzo [a]pyrene and benzo [c]phenanthrene diol epoxide adducts of deoxyadenosine and deoxyguanosine by human DNA polymerase [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(23): 5284-5292(9)
- [9] Katarzyna Bebenek, Agnès Tissier, Ekaterina G. Frank. 5-Deoxyribose Phosphate Lyase Activity of Human DNA Polymerase ϵ in Vitro [J]. J Science, 2001, 291(5511):2156-2159
- [10] Lai Man Chi, Sik Lok Lam. NMR investigation of DNA primer-template models: Structural insights into dislocation mutagenesis in DNA replication [J]. J. FEBS, 2006, 580:6496-6500
- [11] Min Wang, Theodora R. Devereux, Haris G. Vikis. Poli Is a Candidate for the Mouse Pulmonary Adenoma Resistance 2 Locus, a Major Modifier of Chemically Induced Lung Neoplasia [J]. J Cancer Research, 2004, 64:1924-1931
- [12] Thomas A. Kunkel, Youri I. Pavlov, Katarzyna Bebenek. J. Functions of human DNA polymerases η , κ and ι suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates [J]. DNA Repair, 2003, 2:135-149
- [13] Prakash S, Johnson RE, Prakash L. EUKARYOTIC TRANSLESION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function [J]. Annu. Rev. Biochem, 2005, 74:317-353
- [14] Deepak T. Nair, Robert E. Johnson, Louise Prakash. An Incoming Nucleotide Imposes an anti to syn Conformational Change on the Templating Purine in the Human DNA Polymerase- ϵ Active Site [J]. J Structure, 2006, 14: 749-755
- [15] Burgers PM, Koonin EV, Bruford E, Blanco L, Burtis KC, et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature [J]. J Biol Chem, 2001, 276(47):43487-43490
- [16] Masutani C, Kusumoto R, Iwai S and Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase [J]. EMBO J, 2000, 19, 3100-3109