

DNA 连接酶Ⅲ在线粒体基因组完整性保持中的作用*

郭晓强^{1, 2)**} 沈永青^{1)**} 郭振清³⁾ 常彦忠¹⁾ 段相林^{1)***}

(¹⁾ 河北师范大学生命科学学院铁代谢分子生物学研究室, 石家庄 050016;

(²⁾ 解放军白求恩军医学院生化教研室, 石家庄 050081; (³⁾ 河北科技师范学院生命科学系, 秦皇岛 066600)

摘要 真核 DNA 连接酶(DNA ligase)通过催化 ATP 依赖的双链 DNA 切口连接而在 DNA 复制、重组和修复过程中发挥了重要作用。DNA 连接酶Ⅲ(Lig3)是一种独特性的连接酶, 既可定位于细胞核, 又可定位于线粒体。Lig3 通过与 DNA 修复蛋白 XRCC1 作用而参与了碱基切除修复和其他单链断裂修复。但 Lig3 以 XRCC1 不依赖方式在线粒体 DNA 完整性保持方面发挥了更为重要的作用。这些研究为 Lig3 功能和 DNA 修复研究提供了新的视野。

关键词 DNA 连接酶Ⅲ, DNA 修复, 线粒体 DNA, 基因组完整性

学科分类号 Q55

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00172

DNA 连接酶(DNA ligase) (EC 6.5.1.1) 是利用 ATP(真核)或 NAD(细菌)水解供能而将双链 DNA 一条链的切口(nick)实现封闭的一类酶, 在 DNA 复制、修复和重组等过程中均发挥着重要作用^[1]。DNA 连接酶的正常功能保证了基因组的完整性, 基因突变或功能异常可导致多种遗传性疾病^[2]。原核生物 DNA 连接酶于 1967 年由几家实验室同时发现, 真核生物 DNA 连接酶于 20 世纪 90 年代鉴定成功, 对其功能也有了较为全面的认识^[3]。

1 真核生物 DNA 连接酶

目前在真核生物中发现 3 种 DNA 连接酶, 即

DNA 连接酶 I、Ⅲ和Ⅳ, 分别简称为 Lig1、Lig3 和 Lig4^[1-3], 其中 DNA 连接酶 I 和Ⅳ存在于所有真核生物, 而 DNA 连接酶Ⅲ则主要存在于脊椎动物^[4], 人的 3 种 DNA 连接酶基本情况见表 1。3 种 DNA 连接酶在发挥生物学功能时都需要相应伴侣蛋白参与, 如 DNA 连接酶 I 与复制因子增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)相互作用, DNA 连接酶Ⅲ则与 DNA 修复蛋白 XRCC1(X-ray repair cross-complementing protein 1)形成复合物, 而 DNA 连接酶Ⅳ需要 XRCC4 的辅助^[3], 这些功能都是在细胞核内完成, 而 DNA 连接酶Ⅲ还拥有线粒体功能。

Table 1 The basic characteristics of three human DNA ligases

表 1 三种人 DNA 连接酶的基本特征

名称	基因定位	蛋白质	伴侣蛋白	定位	小鼠模型	功能
Lig1	19q13.2-q13.3	919	PCNA	细胞核	胚胎正常发育, 造血异常	DNA 合成
Lig3	17q11.2-q12	1 009	XRCC1	细胞核、线粒体	胚胎致死	碱基切除和单链断裂修复
Lig4	13q22-q34	911	XRCC4	细胞核	胚胎致死	非同源末端连接和 V(D)J 重组

* 国家自然科学基金资助项目(30870265)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0311-86267215, E-mail: xlduan0311@163.com

收稿日期: 2011-04-20, 接受日期: 2011-06-23

2 真核生物 DNA 连接酶Ⅲ的特征及核功能

1995 年, 从牛肝脏和睾丸中纯化了 DNA 连接酶Ⅱ和 DNA 连接酶Ⅲ蛋白, 氨基酸序列分析表明, 二者由同一基因编码^[4-5], 其中 DNA 连接酶Ⅱ主要在非分裂细胞表达, 而 DNA 连接酶Ⅲ则在分裂旺盛细胞内活性较高. 人的 DNA 连接酶Ⅲ基因定位于 17 号染色体(17q11.2-q12)^[6], 编码一个 1 009 个氨基酸残基构成的蛋白质. DNA 连接酶Ⅲ是 3 种连接酶中结构最为独特的一种, 一方面拥有 α 和 β 两种亚型, β 亚型为 α 亚型的 C 端缩短形式^[7], 另一方面还拥有细胞核和线粒体两种定位形式, 通过转录后前体 RNA 的选择性拼接而使其拥有线粒体靶向序列(mitochondrial targeting sequence, MTS), 从而定位于线粒体^[8], 这使 DNA 连接酶Ⅲ就拥有了 4 种类型, 如爪蟾线粒体中就可表达 α 和 β 两种亚型^[9]. 本文以完整 α 亚型线粒体 DNA 连接酶Ⅲ为例来阐述其结构(图 1), N 端拥有一个 MTS 结构而保证线粒体定位, 随后一个 PARP (poly(adenosine-ribose)polymerase)型锌指(zinc finger, ZnF)结构域, 中间靠近 N 端为催化结构域(catalytic domain, CD), 拥有 DNA 连接酶活性, C 端为一个 BRCT(BRCA1 carboxy terminal)结构域, 参与了与其他蛋白质的相互作用(β 亚型缺乏该结构域)^[10].

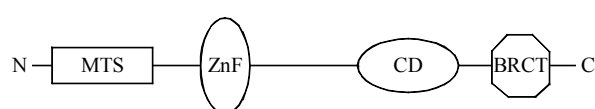


Fig. 1 The protein structure of DNA ligase III^[3]

图 1 DNA 连接酶Ⅲ的蛋白质结构^[3]

DNA 连接酶Ⅲ的 ZnF 结构域对连接酶活性无影响, 主要负责切口 DNA 识别并将酶定位于待连接 DNA 链位点^[11], 结构生物学数据进一步证实了该结论^[12], ZnF 除有利于切口 DNA 识别与结合外, 还可通过调整全酶结构而有利于连接酶活性发挥^[13]. DNA 连接酶Ⅲ的 BRCT 结构域通过与 XRCC1 的 BRCT 结构域相互作用而形成 DNA 连接酶Ⅲ-XRCC1 异源二聚体^[14-15], 该复合物可在 DNA 聚合酶 β 协助下被招募到碱基切除修复损伤位点^[16], 完成切口封闭^[17].

3 真核生物 DNA 连接酶Ⅲ与线粒体基因组完整性

一系列体外和细胞研究初步确定了 DNA 连接酶Ⅲ在核 DNA 碱基切除修复和同源重组中的重要作用及分子机制, 此外 DNA 连接酶Ⅲ还具有重要的线粒体功能. 应用反义技术降低 DNA 连接酶Ⅲ表达可减少 mtDNA 含量, 同时 mtDNA 单链切口增多, 对 γ 射线引起的 mtDNA 修复能力丧失^[18], 酵母 DNA 连接酶 CDC9 也可定位于线粒体, 其失活可导致线粒体 DNA 含量急剧下降^[19], 初步说明 DNA 连接酶Ⅲ对线粒体基因组的重要性.

2006 年, Puebla-Orsorio 等^[20]获得了 DNA 连接酶Ⅲ缺失小鼠, 小鼠出现早期胚胎致死现象, 交配 8.5 天后胚胎发育出现停滞, 在 9.5 天出现大量细胞凋亡, 最终胚胎死亡. DNA 连接酶Ⅲ缺失引起的胚胎致死无法由另外 2 种连接酶弥补, 说明了其功能的独特性, 但具体生物学作用仍无法判断, 最近两项研究取得了重要进展^[21-22].

Gao 等^[21]获得了小鼠神经系统 DNA 连接酶Ⅲ条件性敲除小鼠, 结果小鼠胚胎发育正常, 出生后与正常小鼠无明显区别, 但 2 周后敲除小鼠发育出现迟缓并表现出复杂的神经系统共济失调表型, 大部分小鼠 20 天左右死亡. 磁共振成像显示敲除小鼠 14 天时小脑明显变小, 颗粒神经元前体细胞增殖力下降, 而细胞凋亡增加, 从而造成这些细胞数量急剧减少. Gao 等^[22]还获得了心肌和骨骼肌 DNA 连接酶Ⅲ特异性缺失小鼠, 所有小鼠在 3.5 到 4.5 周之间死亡, 观察发现, 小鼠心脏出现缺陷, 整个心脏比对照小鼠大, 心房和心室出现扩张, 同时心室壁明显变薄. 对 DNA 连接酶Ⅲ缺失小鼠神经元和心肌细胞观察发现, 其线粒体 DNA 含量均出现异常和损失增加. Simsek 等^[22]首先将小鼠胚胎干细胞内的 DNA 连接酶Ⅲ敲除, 结果造成细胞死亡, 随后再利用转基因方法来观察不同类型 DNA 连接酶Ⅲ的效应, 结果发现只有野生型和线粒体型 DNA 连接酶Ⅲ可增加细胞生存力, 而核型 DNA 连接酶Ⅲ则无此能力.

研究还发现, DNA 连接酶Ⅲ神经系统条件敲除小鼠和 Xrcc1 敲除小鼠在表型上存在明显区别, 特别是 Xrcc1 缺失后基因组 DNA 对离子辐射和过氧化氢敏感性急剧增加, 但 DNA 连接酶Ⅲ缺失与野生型细胞相比对离子辐射和过氧化氢敏感性无明

显差别^[21]。早期一系列证据已确定这个结论, *Xrcc1* 不定位于线粒体, *Xrcc1* 缺失对线粒体型 DNA 连接酶Ⅲ活性无任何影响, 并且 *Xrcc1* 缺乏只造成核 DNA 损伤显著增多, 但不影响线粒体 DNA 含量和修复系统^[23]。转基因实验也证实了这个结论, 缺失了 BRCT 结构域的线粒体型 DNA 连接酶Ⅲ(无法与 *Xrcc1* 相互作用)仍可弥补细胞内 DNA 连接酶Ⅲ缺失, 甚至 ZnF 结构域也非 DNA 连接酶Ⅲ在线粒体发挥活性所必需^[22]。研究还发现, 小鼠 DNA 连接酶Ⅰ、小球藻病毒(*Chlorella virus*)DNA 连接酶、甚至以 NAD 作为辅助因子的大肠杆菌 DNA 连接酶, 在添加 MTS 序列后也可代替小鼠 DNA 连接酶Ⅲ在线粒体中发挥功能, 这说明只有连接酶活性是 DNA 连接酶Ⅲ在线粒体基因组完整性保持方面才是必需的。

线粒体 DNA 完整性对生物体具有十分重要的意义。一方面线粒体 DNA 生成障碍可造成胚胎致死^[24], DNA 连接酶Ⅲ缺失可造成 mtDNA 在复制和 / 或修复水平上出现损伤^[21]; 另一方面线粒体 DNA 损伤与衰老过程密切相关^[25], 这是因为线粒体是细胞进行氧化磷酸化的场所, 产生大量自由基造成 DNA 损伤更为严重, 因此修复系统缺陷破坏了线粒体 DNA 基因组完整性^[26], 部分 DNA 连接酶Ⅲ神经系统条件敲除小鼠即使未早期死亡, 也会出现衰老提前的表型^[21]。

4 研究意义和展望

DNA 连接酶通过连接双链 DNA 上的切口而保证了 DNA 的完整性, 而作为唯一定位于线粒体的 DNA 连接酶Ⅲ在线粒体基因组完整性保持方面发挥了更为重要的作用, 对避免胚胎致死、减缓衰老和退行性疾病等均有重要益处。

目前, DNA 连接酶Ⅲ保持线粒体基因组完整性的作用机制还知之甚少, 前期研究表明, DNA 连接酶Ⅲ酶催化中心本身也可识别切口 DNA, 这可部分解释不需要 ZnF 结构域的原因^[27], DNA 聚合酶 γ 可与 DNA 连接酶Ⅲ相互作用而参与线粒体 DNA 完整性的保持^[28], 但具体细节尚待深入探索。尽管 DNA 连接酶Ⅲ为非基因组 DNA 完整性所必需^[21-22], 但它可协助 DNA 连接酶Ⅰ发挥生物学作用^[21, 29], DNA 连接酶Ⅲ还与细胞凋亡及肿瘤发生相关^[30], 这些问题都需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Tomkinson A E. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem*, 2008, **77**: 313-338
- [2] Shuman S. DNA ligases: progress and prospects. *J Biol Chem*, 2009, **284**(26): 17365-17369
- [3] Martin I V, MacNeill S A. ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol*, 2002, **3**(4): REVIEWS3005
- [4] Chen J, Tomkinson A E, Ramos W, *et al.* Mammalian DNA ligase Ⅲ: molecular cloning, chromosomal localization, and expression in spermatocytes undergoing meiotic recombination. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**(10): 5412-5422
- [5] Husain I, Tomkinson A E, Burkhart W A, *et al.* Purification and characterization of DNA ligase Ⅲ from bovine testes. Homology with DNA ligase Ⅱ and vaccinia DNA ligase. *J Biol Chem*, 1995, **270**(16): 9683-9690
- [6] Wei Y F, Robins P, Carter K, *et al.* Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase Ⅳ and DNA ligase Ⅲ, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**(6): 3206-3216
- [7] Mackey Z B, Ramos W, Levin D S, *et al.* An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase Ⅲ with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**(2): 989-998
- [8] Lakshmipathy U, Campbell C. The human DNA ligase Ⅲ gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(5): 3869-3876
- [9] Perez-Jannotti R M, Klein S M, Bogenhagen D F. Two forms of mitochondrial DNA ligase Ⅲ are produced in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 2001, **276**(52): 48978-48987
- [10] Mackey Z B, Niedergang C, Murcia J M, *et al.* DNA ligase Ⅲ is recruited to DNA strand breaks by a zinc finger motif homologous to that of poly (ADP-ribose) polymerase. Identification of two functionally distinct DNA binding regions within DNA ligase Ⅲ. *J Biol Chem*, 1999, **274**(31): 21679-21687
- [11] Taylor R M, Whitehouse J, Cappelli E, *et al.* Role of the DNA ligase Ⅲ zinc finger in polynucleotide binding and ligation. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(21): 4804-4810
- [12] Kulczyk A W, Yang J C, Neuhaus D. Solution structure and DNA binding of the zinc-finger domain from DNA ligase Ⅲ alpha. *J Mol Biol*, 2004, **341**(3): 723-738
- [13] Cotner-Gohara E, Kim I K, Hammel M, *et al.* Human DNA ligase Ⅲ recognizes DNA ends by dynamic switching between two DNA-bound states. *Biochemistry*, 2010, **49**(29): 6165-6176
- [14] Nash R A, Caldecott K W, Barnes D E, *et al.* XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase Ⅲ. *Biochemistry*, 1997, **36**(17): 5207-5211
- [15] Dulic A, Bates P A, Zhang X, *et al.* BRCT domain interactions in

- the heterodimeric DNA repair protein XRCC1-DNA ligase III. *Biochemistry*, 2001, **40**(20): 5906–5913
- [16] Parsons J L, Dianova I I, Allinson S L, *et al.* DNA polymerase beta promotes recruitment of DNA ligase III alpha-XRCC1 to sites of base excision repair. *Biochemistry*, 2005, **44**(31): 10613–10619
- [17] Moser J, Kool H, Giakzidis I, *et al.* Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell*, 2007, **27**(2): 311–323
- [18] Lakshmipathy U, Campbell C. Antisense-mediated decrease in DNA ligase III expression results in reduced mitochondrial DNA integrity. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(3): 668–676
- [19] Donahue S L, Corner B E, Bordone L, *et al.* Mitochondrial DNA ligase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(7): 1582–1589
- [20] Puebla-Osorio N, Lacey D B, Alt F W, *et al.* Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(10): 3935–3941
- [21] Gao Y, Katyal S, Lee Y, *et al.* DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair. *Nature*, 2011, **471**(7337): 240–244
- [22] Simsek D, Furda A, Gao Y, *et al.* Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature*, 2011, **471**(7337): 245–248
- [23] Lakshmipathy U, Campbell C. Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(20): 3880–3886
- [24] Cerritelli S M, Frolova E G, Feng C, *et al.* Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell*, 2003, **11**(3): 807–815
- [25] Gredilla R, Bohr V A, Stevensner T. Mitochondrial DNA repair and association with aging—an update. *Exp Gerontol*, 2010, **45**(7–8): 478–488
- [26] Kang D, Hamasaki N. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet*, 2002, **41**(5): 311–322
- [27] De A, Campbell C. A novel interaction between DNA ligase III and DNA polymerase gamma plays an essential role in mitochondrial DNA stability. *Biochem J*, 2007, **402**(1): 175–186
- [28] Cotner-Gohara E, Kim I K, Tomkinson A E, *et al.* Two DNA-binding and nick recognition modules in human DNA ligase III. *J Biol Chem*, 2008, **283**(16): 10764–10772
- [29] Mortusewicz O, Rothbauer U, Cardoso MC, *et al.* Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(12): 3523–3532
- [30] Wang H, Rosidi B, Perrault R, *et al.* DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, 2005, **65**(10): 4020–4030

The Function of DNA Ligase III in Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity*

GUO Xiao-Qiang^{1,2**}, SHEN Yong-Qing^{1**}, GUO Zhen-Qing³, CHANG Yan-Zhong¹, DUAN Xiang-Lin^{1***}

⁽¹⁾ Laboratory of Iron Metabolism and Molecular Biology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

⁽²⁾ Department of Biochemistry, Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China;

⁽³⁾ Department of Life, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China)

Abstract Eukaryotic DNA ligases play vital roles in DNA replication, recombination and repair through catalyzing ligation of nick in double-stranded DNA with an ATP-dependent reaction. DNA ligase III (Lig3) is a unique ligase which is located in both nucleus and mitochondrion. Lig3 plays important roles in base excision repair and other single-stranded break repairs with its DNA repair protein XRCC1. But Lig3 is more important in maintenance of mitochondrial DNA (mtDNA) integrity without XRCC1-dependent DNA repair. These researches provide new perspective for Lig3 function and DNA repair.

Key words DNA ligase III, DNA repair, mitochondrial DNA, genomic integrity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00172

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870265).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-311-86267215, E-mail: xlduan0311@163.com

Received: April 20, 2011 Accepted: June 23, 2011