

大肠杆菌细胞 DNA 复制、修复和重组途径的衔接*

邱洁芳 潘学峰**

(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

摘要 以大肠杆菌为例围绕相关领域的研究动态进行分析和总结。DNA 复制、损伤修复和重组过程的相互作用关系研究是当今生命科学研究的前沿和热点之一。越来越多的研究表明, 在分子水平上, DNA 复制、损伤修复和重组过程既彼此独立, 又相互依存。上述途径可以通过许多关键蛋白质之间的相互作用加以协调和整合, 并籍此使遗传物质 DNA 得到有效的维护和忠实的传递。需要指出的是, 基于许多细胞内关键蛋白及其功能在生物界中普遍保守性的事实, 相信来自大肠杆菌有关 DNA 复制、修复和重组之间的研究成果也会对相关真核生物的研究提供借鉴。

关键词 DNA 复制, 损伤修复, 重组

学科分类号 Q291/Q75

细胞的正常增殖和遗传稳定性离不开 DNA 的复制(replication)、损伤修复(damage repair)和重组(recombination)等。习惯上, 这些过程被称为 3R 过程。其中, DNA 复制可以使遗传信息携带者 DNA 得到忠实的倍增, 而 DNA 损伤修复则会在一定程度上保证遗传实体尽可能稳定。对于基因重组而言情况则相对复杂, 既可以作为辅助手段参与 DNA 复制, 同时也参与某些类型 DNA 损伤的修复, 以及负责遗传物质进化过程中的重新排列和组合。

越来越多的研究结果表明, DNA 的复制、损伤修复和重组过程之间既相对独立, 也存在着密切的联系。比如, 参与 DNA 复制的 DNA 聚合酶也参与 DNA 损伤修复和重组过程。大肠杆菌细胞内的 DNA 聚合酶 I 既在 DNA 的复制过程中起作用(冈崎片段 5' 的切除修复)也在 DNA 损伤修复中发挥作用^[1]。此外, 细胞内存在的主要 DNA 损伤修复机制均与 DNA 复制、转录相耦联, 可能 DNA 复制或转录过程中某些 DNA 损伤更容易在瞬间出现的裸露 DNA 链上被 DNA 损伤修复蛋白加以识别^[2]。DNA 重组除了参与正常细胞增殖过程外(在减数分裂时负责染色体交叉互换的拆分), 同时, 也主要参与了修复 DNA 单链空缺和 DNA 双链断裂损伤, 是一种重要的修复机制——重组修复。细胞在逆境状态或一些与正常 DNA 合成途径相关的

突变体中, 会采用同源重组依赖的 DNA 复制等。

1 DNA 复制、损伤修复和重组的组织原则

1.1 基于 DNA 单链空缺大小限制的空间调控方式

在 DNA 新陈代谢过程中, 体内作为中间产物的 DNA 构象类型是有限的^[3~5]。目前在 DNA 的复制、损伤修复和重组工作模型中, 最常用的 3 种 DNA 构象分别是 DNA 复制叉、DNA 单链空缺和 DNA 双链断裂。对于不同的 DNA 单链空缺而言, 其彼此之间的区别标志主要在于缺口的大小。例如, DNA 后随链复制过程是以一个冈崎片段为单位进行的。在这个过程中, 已经合成的冈崎片段和刚刚起始复制的冈崎片段之间就是一个典型的单链空缺, 其平均长度为几百个碱基。与此类似, 在碱基错配修复过程中可以制造出含有 1 000 个碱基左右的空缺。但在碱基或核苷酸切除修复时出现的 DNA 单链空缺则较小, 分别为 1~8 bp 和 1~30 bp。

现有的发现表明, 单链 DNA 空缺往往是 DNA 3R 过程的重要场所。但 3R 过程中的不同蛋白质组分所能识别的单链空缺大小彼此不尽相同。比如, RecA 蛋白是大肠杆菌同源重组过程的第一

* 北京理工大学自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。Tel: 010-68914495-802

E-mail: xuefengpancam@yahoo.com.cn, xuefengpan@yahoo.com.sg

收稿日期: 2008-01-26, 接受日期: 2008-04-15

个蛋白质, 但 RecA 起始要求单链空缺需含 70 bp 以上. 因此, 这在一定程度上限制了在较短的 DNA 单链空缺区域发生同源重组. 因此, 在碱基或核苷酸切除修复过程中, 往往采取利用 DNA 复制对修复过程中产生的单链空缺进行填充, 而不太可能会借助同源重组进行修复. 但是, 一旦单链缺口足够大, 比如被干扰的 DNA 复制叉所留下的单链缺口, 或者在 DNA 错配修复时产生的缺口等, 由于它们往往含有几百到上千个核苷容量, 所以既容许 DNA 复制方式的修复也支持 DNA 同源重组方式的修复. 类似的情况也见于使用单链 DNA 核酸外切酶扩大单链空缺区域, 或者使用 DNA 聚合酶缩小单链空缺区域.

随着 DNA 单链空缺区域的增大, DNA 会比较

容易出现自折叠, 出现非 B 型 DNA 二级结构, 如 DNA 发卡结构(DNA hairpins)、G-DNA 四链结构(G-quadruple structures) 和 H-DNA 结构(H-DNA structures) 等等^[6,7](表 1). 这些不正常的 DNA 折叠将破坏程序化 DNA 的复制、损伤修复和重组过程. 为了避免这样的事件发生, 单链结合蛋白如大肠杆菌的 SSB、真核生物的 RPA 以及其他单链 DNA 识别蛋白如大肠杆菌的 RecF、RecR、RecO、RecA 和酵母与哺乳动物的蛋白质复合体 RAD51/Brca2, 竞争结合到 DNA 单链空缺区域. 显然, SSB/RPA 结合到 DNA 单链空缺区域将利用复制型 DNA 聚合酶进行 DNA 复制, 而 Rec 蛋白结合到 DNA 单链空缺区域将促进同源重组、SOS 反应的诱导或者 DNA 跨缺刻合成^[3,4,8-14].

Table 1 Non-B DNA conformations^[15]

表1 DNA非B型构象^[15]

名 称	序列特征	序 列	构 象
H-DNA 结构	镜像重复序列	$\begin{array}{c} \text{AAGAGGGGAGAA} \\ \text{TTCTCCCTCTT} \end{array}$	
G-DNA 四链结构	寡聚(G) _n 序列	AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ 单链	
DNA 发卡结构	同向重复序列	$\begin{array}{c} \text{TCGGTTCGGT} \\ \text{AGCCAAGCCA} \end{array}$	
DNA 十字形结构	反向重复序列	$\begin{array}{c} \text{TCGGTACCGA} \\ \text{AGCCATGGCT} \end{array}$	
Z 型 DNA	(YR•YR) _n	$\begin{array}{c} \text{CGCGTGCGTGT} \\ \text{GCGCACGCACA} \end{array}$	

1.2 基于蛋白质间相互作用的有效调控方式

遗传信息的表达和维护包含许多生化步骤, 靠单一的蛋白质是无法完成的, 所以 DNA 的复制、损伤修复和重组过程涉及蛋白质间相互作用并常以蛋白质复合体的形式执行功能, 同时通过蛋白质的组装与去组装达到各途径的协调控制.

1.2.1 DNA 修复与复制.

大肠杆菌的错配修复所拥有的蛋白质组分包括 MutS、MutL、MutH、Dam 等专用蛋白质以及外切核酸酶和相应的 DNA 螺旋酶. 真核生物细胞中

也有类似的蛋白质组分, 如 MSH1-6 是 MutS 的同源蛋白. 最近已有研究表明, DNA 复制过程中的 PCNA 会与 MSH2•MSH3 和 MSH2•MSH6 蛋白质复合物相互作用, 暗示 PCNA 可能参与错配修复的识别^[16]. 大肠杆菌的 MutS、MutL 也能与聚合酶 III 的 β 亚基相互作用(图 1, 图 2). MutS 上有两个区域可以与 β 亚基结合, 一个接近 C 端, 一个靠近 N 端. MutL 则通过其 ATP 结合位点附近的一个环状结构与 β 亚基结合. 三者间的相互作用使 DNA 聚合酶 III 的核心酶离开, UvrD 及外切核

酸酶结合去降解含错配碱基的新链, 展开错配修复^[17]. 此外, β clamp 还能与 DNA 聚合酶 I、DNA 聚合酶 II、DNA 聚合酶 IV 和 DNA 聚合酶 V 相互作用, 从而影响 DNA 复制、修复和跨损伤合成过程中不同 DNA 聚合酶之间的转换^[18].

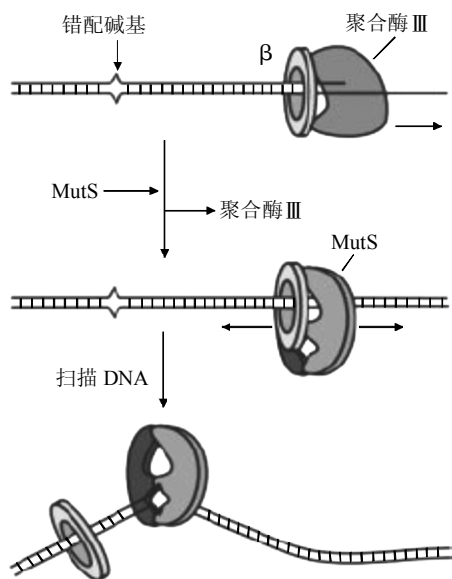


Fig. 1 Model of MutS function with the β clamp^[17]

图 1 MutS 与 β clamp 相互作用示意图^[17]

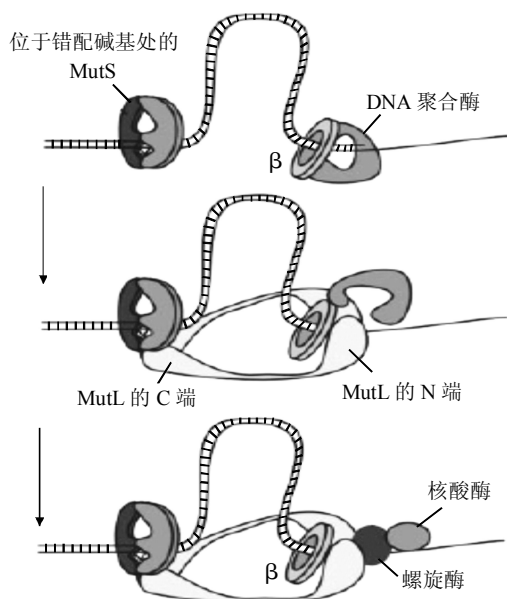


Fig. 2 Model of MutL function with the β clamp^[17]

图 2 MutL 与 β clamp 相互作用示意图^[17]

DNA 聚合酶 I 参与核苷酸切除修复和 DNA 复制时冈崎片段的合成. 研究发现, 大肠杆菌完全缺乏 DNA 聚合酶 I 时在基本培养基里仍有生活力, 这种生活力依赖于参与核苷酸切除修复的 UvrA、UvrB 和 UvrD 以及其他未鉴别的蛋白质, 如聚合酶和核酸外切酶, 它们接管了 DNA 聚合酶 I 在 DNA 复制中的功能. 这种替代复制途径有助于提高细菌逆境时的存活率^[19].

DNA 聚合酶 V 和 RecA 是 DNA 损伤时跨缺刻合成的必要成分, DNA 聚合酶 V 和 RecA 相互作用会进一步加强 DNA 跨缺刻合成, 构成一种新的 DNA 聚合酶调控机制^[20].

1.2.2 DNA 修复与重组.

参与核苷酸切除修复的 UvrA、UvrB 与同源重组 RecF 途径的 RecQ 螺旋酶能抑制某些类型的非法重组. 在 UvrA、UvrB 突变体及 UvrA、RecQ 双突变体中, 紫外线诱导的非法重组率增加^[21]. UvrD 也有抗重组功能^[3, 19]. UvrD 能降低自发或紫外线诱导的非法重组率^[22].

碱基错配修复对重组的抑制作用是由于错配修复对于杂交 DNA 序列(不包括完全相同的序列)中的非 B 型配对有很高的识别能力, 在重组的各个阶段都会有被错配修复识别的底物, 错配对识别蛋白与之作用并影响重组的进行. 这种抑制对同源重组也存在影响. MutS、MutL 提高了异源双链 DNA 形成的能障, 使 RecA-DNA 或 UvrAB-DNA 复合体不稳定. 抑制作用需要碱基错配结构的形成并利用 ATP. 对 ATP 缺陷型突变体 MutS501, UvrAB 对链交换的促进作用不被抑制^[23]. 因此, MutS-MutL 复合体在大肠杆菌中可视为错配修复和抗同源重组的分子^[24].

1.2.3 DNA 重组与复制.

大肠杆菌为了生存, 被异常 Ter 位点阻滞的复制叉采用同源重组的 RecBCD 途径和 SOS 诱导途径. 此时, 研究表明 UvrD 也是必要的. UvrD 使 Tus 蛋白从 Ter 位点移开, 以便重组依赖的复制叉通过 Ter/Tus 复合体^[25].

复制位点前方的单链 DNA 区域, 复制酶和重组酶在此时常发生竞争作用^[26]. 大肠杆菌中, RecA 以及其他重组蛋白常在复制过程中出现, 以便在损伤的复制叉处引发重组. RecA-ssDNA 可作为 SOS 应答的信号分子, 负责某些情况下 DNA 复制叉的回转, 同时也参与 DNA 聚合酶 V 催化的 DNA 跨缺刻合成^[3]. 螺旋酶 Rep 和 PriA 阻止 RecA

的这个行为, 控制复制叉处重组的引发^[27]. DNA 结合蛋白 RdcC 也能调节 RecA 的活性^[28]. 此外, RecA 蛋白能削弱体内 DNA 聚合酶 II、V 的功能, 可能对 DNA 聚合酶 III、IV 也有同样的作用, 影响 DNA 聚合酶调控的 DNA 复制、修复与重组过程^[18].

2 总结与展望

很多情况下, DNA 的复制、损伤修复和重组与威胁人类健康的肿瘤和遗传病的发生密切相关. 比如遗传性结肠癌与错配修复、皮肤癌症与核苷切除修复、人类染色体三体综合征与基因重组功能缺陷等, 这些 DNA 修复缺陷细胞表现出对辐射和致癌剂的敏感性增加. 此外, 还有各种神经性疾病由 DNA 修复缺陷引起^[29], 使得这一研究领域吸引了许多科学家的目光.

现在关于 DNA 的复制、损伤修复和重组的研究有如下特点, 一是对 DNA 的复制、损伤修复和重组所遵循的机制和有关的蛋白质分别进行更加深入彻底的研究, 另一方面基于细胞是一个有机的整体, 因此对各种途径之间的协调关系展开了广泛的研究. 这样的研究现状体现了“部分”和“整体”兼顾的研究特点.

原核生物比真核生物在 DNA 的复制、损伤修复和重组方面的研究更加成熟, 通过对 DNA 复制、损伤修复和重组过程之间调控关系的研究, 发现了不少关键蛋白质, 比如 RecA、RecR、RecF 和 MutS 等等, 它们往往参与多条途径 (图 3,

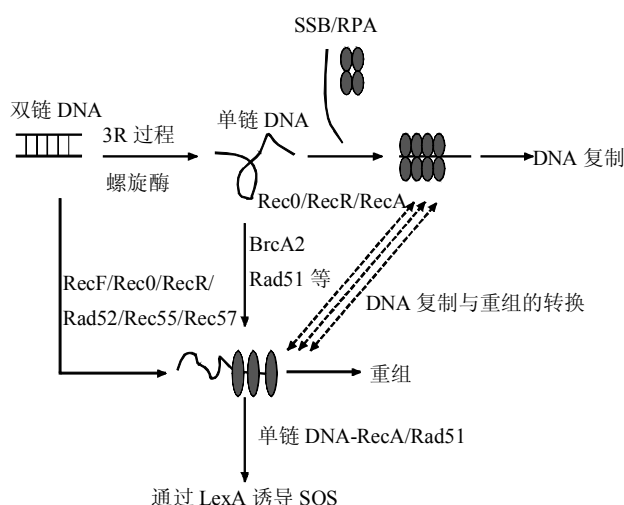


Fig. 3 Similarities of intermediates and connection between DNA replication and homologous recombination

图 3 DNA 复制和重组途径具有相似的中间体

单链 DNA、单链 DNA 结合蛋白以及 RecOR/Rad52 家族蛋白的相互作用阻止 ssDNA 形成非 B 型二级结构.

图 4). 反之, 研究关键蛋白质之间的相互关系, 也有利于进一步揭示 DNA 复制、损伤修复和重组过程之间的调控关系. 另外, 原核生物的这些关键蛋白质很多在真核生物中也具有保守性, 所以对在真核生物中进行相关研究很有借鉴意义.

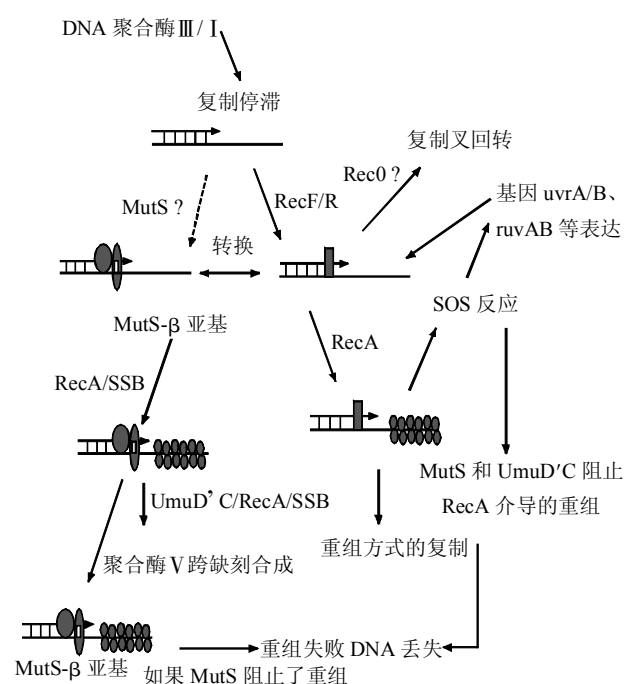


Fig. 4 A unified linkage of DNA replication, repair and recombination based on *E. coli* DNA metabolism^[30]

图 4 大肠杆菌中 DNA 复制、修复和重组途径的调控关系^[30] DNA 复制遇损伤停滞, 3'端被蛋白质 RecF/R 或 RecF/MutS 占据, 形成 RecFR-DNA 复合体, 使邻近的 3'端单链区域不与 RecA 结合形成蛋白纤维丝. 若形成 RecA 蛋白纤维丝, SOS 反应和同源重组修复将被启动, 使停滞的 DNA 复制通过复制叉反转和同源重组重新开始. 3'端被蛋白质 RecF/R 占据, 某种程度上避免了 3'端与互补链脱离, 这点与 PriA 和 PriC 蛋白在重新装配复制体的功能上有重叠. 同样, 形成 MutS-β Clamp 复合体可能有两个作用: 一是保护 β Clamp 不被 RecA* 挤开, 以便接下来复制体的组装; 二是可能有助于 DNA 复制 3'端的处理, 类似于 MSH2-MSH3 在同源重组中的作用.

参 考 文 献

- Xu Y, Grindley N D F, Joyce C M. Coordination between the polymerase and 5' nuclease components of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000, **275**(27): 20949~20955
- Stauffer M E, Chazin W J. Structural mechanisms of DNA replication, repair, and recombination. J Biol Chem, 2004, **279**: 30915~30918
- Kuzminov A. Recombination repair of DNA damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, **63**: 751~813

- 4 Paques F, Haber J E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, **63**(2): 349~404
- 5 Thompson L H, Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. Mutation Res, 2002, **509**: 49~78
- 6 Sinden R R, Potaman V N, Oussatcheva E A, *et al.* Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. J Biosci, 2002, **27**(1 Suppl 1): 53~65
- 7 Leach D R. Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. Bioessays, 1994, **16**(12): 893~900
- 8 Kowalczykowski S C, Dixon D A, Eggleston A K, *et al.* Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiological Rev, 1994, **58**(3): 401~405
- 9 Asai T, Kogoma T. The RecF pathway of homologous recombination can mediate the initiation of DNA damage-inducible replication of the *Escherichia coli* chromosome. J Bacteriol, 1994, **176**(22): 7113~7114
- 10 Bork J M, Cox M M, Inman R B. The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single-stranded DNA. EMBO J, 2001, **20**: 7313~7322
- 11 Morimatsu K, Kowalczykowski S C. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: A universal step of recombination repair. Mol Cell, 2003, **11**: 1337~1347
- 12 Webb B L, Cox M M, Inman R B. Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. Cell, 1997, **91**(3): 347~356
- 13 Umez K, Chi N W, Kolodner R D. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**: 3875~3879
- 14 Hegde S P, Qin M H, Li X H, *et al.* Interactions of RecF protein with RecO, RecR, and single-stranded DNA binding proteins reveal roles for the RecF-RecO-RecR complex in DNA repair and recombination. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**: 14468~14473
- 15 Bacolla A, Wells R D. Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. J Biol Chem, 2004, **279**: 47411~47414
- 16 Lau P J, Kolodner R D. Transfer of the MSH2. MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. J Biol Chem, 2003, **278**(1): 14~17
- 17 López de Saro F J, Marinus M G, Modrich P, *et al.* The β sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS. J Biol Chem, 2006, **281**: 14340~14349
- 18 Maul R W, Sutton M D. Roles of the *Escherichia coli* RecA protein and the global SOS response in effecting DNA polymerase selection *in vivo*. J Bacteriol, 2005, **187**: 7607~7618
- 19 Moolenaar G F, Moorman C, Goosen N. Role of the *Escherichia coli* nucleotide excision repair proteins in DNA replication. J Bacteriol, 2000, **182**: 5706~5714
- 20 Schlacher K, Cox M M, Woodgate R, *et al.* RecA acts in trans to allow replication of damaged DNA by DNA polymerase V. Nature, 2006, **442**(7105): 883~887
- 21 Hanada K, Iwasaki M, Ihashi S, *et al.* UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: synergistic action with RecQ helicase. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**: 5989
- 22 Shiraishi K, Imai Y, Yoshizaki S, *et al.* The role of UvrD in RecET-mediated illegitimate recombination in *Escherichia coli*. Genes Genet Syst, 2006, **81**(4): 291~297
- 23 Fabisiewicz A, Worth L Jr. *Escherichia coli* MutS, L modulate RuvAB- dependent branch migration between diverged DNA. J Biol Chem, **276**: 9413~9420
- 24 Junop M S, Yang W, Funchain P, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. DNA Repair (Amst), 2003, **2**(4): 387~405
- 25 Bidnenko V, Lestini R, Michel B. The *Escherichia coli* UvrD helicase is essential for Tus removal during recombination-dependent replication restart from Ter sites. Mol Microbiol, 2006, **62**(2): 382~396
- 26 Delmas S, Matic I. Interplay between replication and recombination in *Escherichia coli*: impact of the alternative DNA polymerases. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **103**: 4564~4569
- 27 Mahdi A A, Buckman C, Harris L, *et al.* Rep and PriA helicase activities prevent RecA from provoking unnecessary recombination during replication fork repair. Genes & Dev, 2006, **20**: 2135~2147
- 28 Briggs G S, McEwan P A, Yu J, *et al.* Ring structure of the *Escherichia coli* DNA-binding protein RdgC associated with recombination and replication fork repair. J Biol Chem, 2007, **282**: 12353~12357
- 29 Kalluri S R. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. Nature, 2007, **3** (4): 162~172
- 30 Pan X. Self-maintenance of gene and occurrence of genetic diseases. Beijing: Science Press, 2004. 1~403

The Linkage of DNA Replication, Repair and Recombination in *E. coli**

QIU Jie-Fang, PAN Xue-Feng**

(School of Life Science & Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 10081, China)

Abstract The investigations on the interactive relationships of DNA replication, damage repair and recombination have been locating in the frontline and becoming one of the hotspots in today's life science research. More and more studies show that the processes of DNA replication, damage repair and recombination are both independent and interdependent in the molecular level. These pathways coordinate and conform each other through interactions of many critical proteins in the pathways, by which DNA molecules, known as genetical materials, can be well maintained in cell and faithfully transferred through cellular generations. By using *E. coli* as a model system, the recent progresses and the possible rules underlying *E. coli* DNA replication, repair and recombination have been analyzed. As it is believed that the researches on *E. coli* DNA replication, repair and recombination may be capable of providing clues to the eukaryotic research based on the universal conservations of the critical proteins in the pathways.

Key words DNA replication, repair, recombination

*This work was supported by a grant from Beijing Institute of Technology Natural Science Foundation of China.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-68914495-802, E-mail: xuefengpancam@yahoo.com.cn, xuefengpan@yahoo.com.sg

Received: January 26, 2008 Accepted: April 15, 2008