

Ch26 DNA Restructuring: Repair, Recombination, Rearrangement, Amplification	
教師：王子堅	日期：2014/6/5
撰稿組：伯恩、靖軒、聖揚	審稿組：士軒、文儒、沛庭、冠輔

Outline:

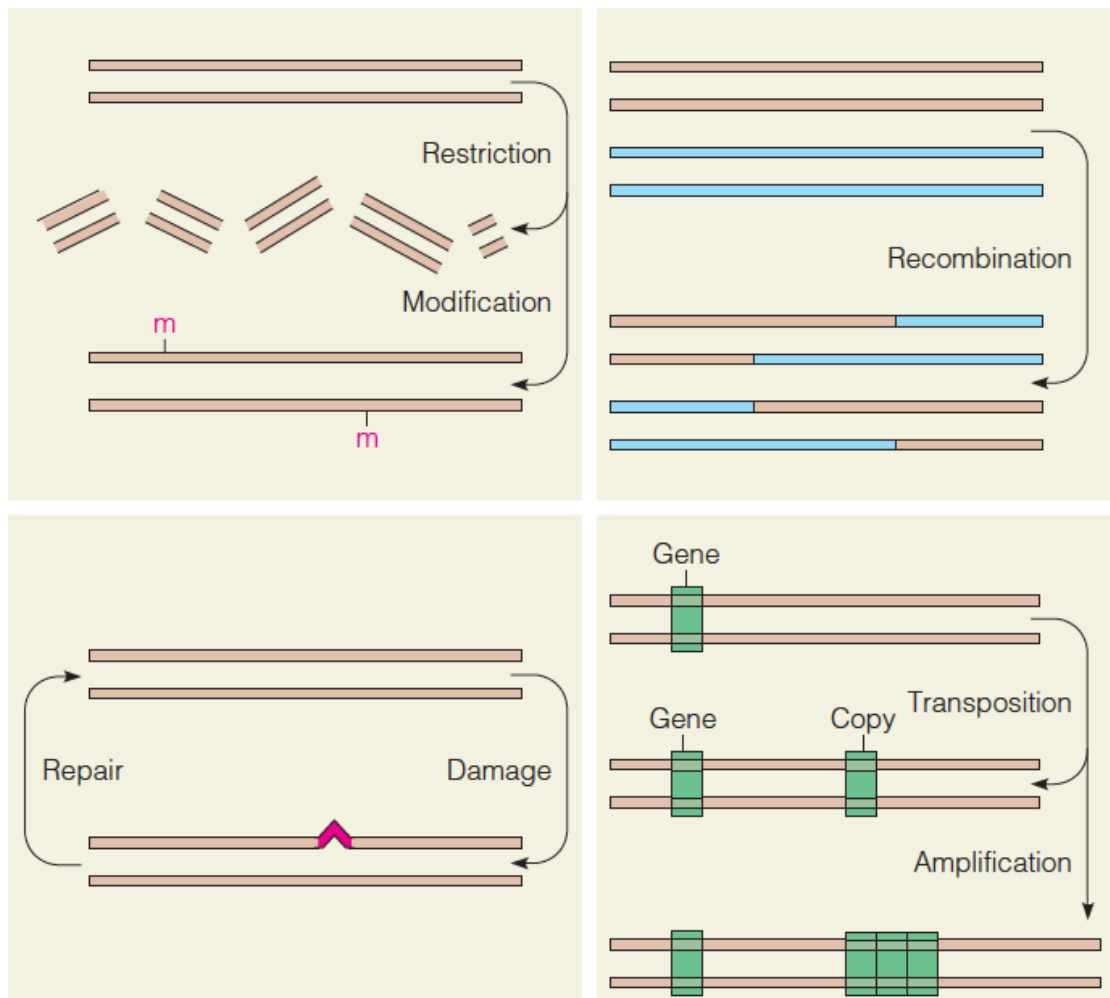
DNA Repair

Recombination

Gene Rearrangements

Gene Amplification

訊息重組方式的概略介紹

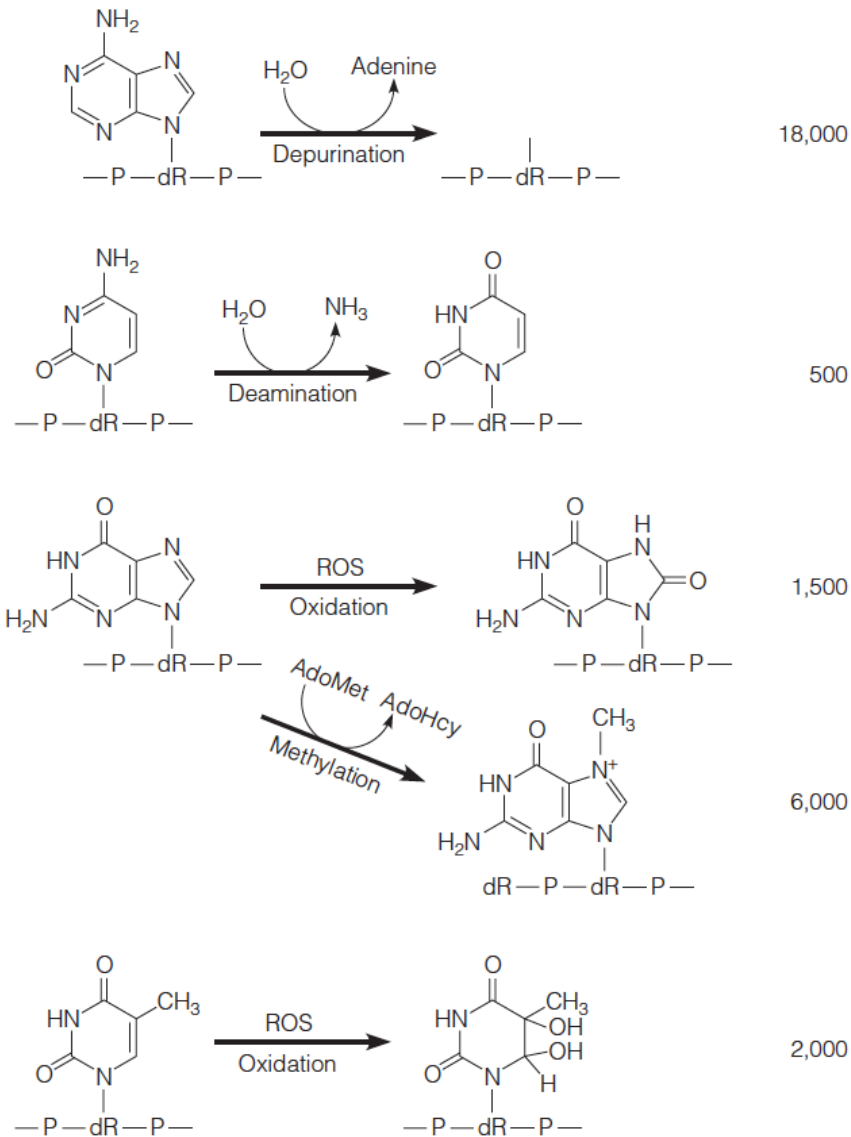


Restriction:限制 Modification:修飾 Recombination:重組

Transposition:轉位(也算 rerecombination 的一種) Amplification:擴增

內源性 DNA 損傷反應(自發性反應):

1. 脫嘌呤(depuration): glycosidic bond 斷裂 purin 掉下
2. 脫氨(deamination):鹼基上的 amino group 去掉( cytosine into uracil)
3. 自由基氧化: ROS、甲基化(第七個 position)



### 環境性 DNA 損傷因子

#### 1. 物理性 reagents :

- (1) 游離輻射
- (2) X 光、紫外光

#### 2. DNA 甲基化 reagents

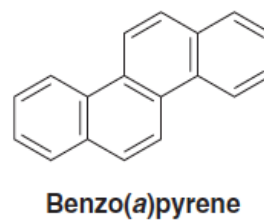
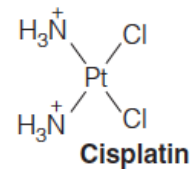
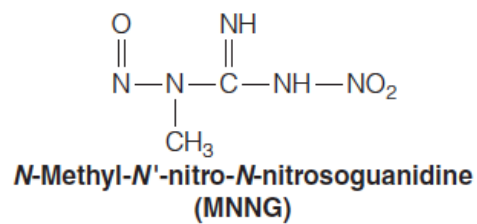
- (1) MNNG: 甲基化 DNA
- (2) EMS: 乙基化 DNA

#### 3. DNA-cross-linking reagents

- (1) Cisplatin: 產生 cross linking

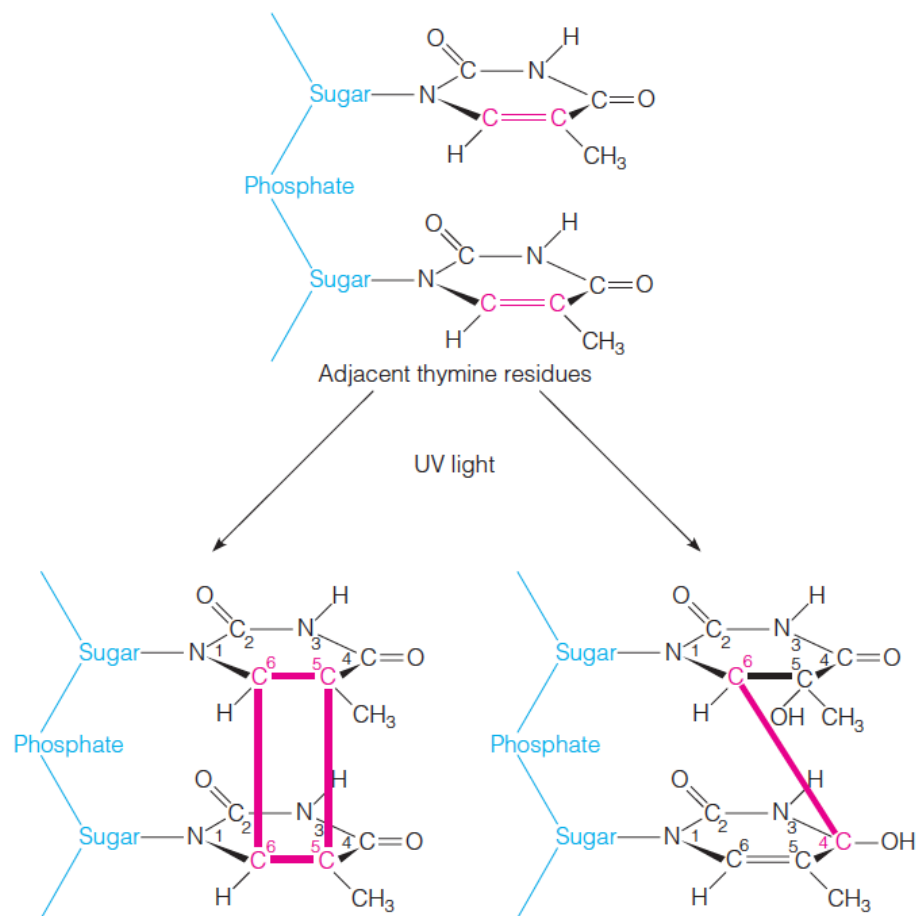
#### 4. 龐大的親電子 agents

- (1) Benzo[a]pyrene: 抽菸
- (2) 黃麴毒素



photoproducts:

受到過量 UV 照射時，兩個同股鄰近的 **pyrimidine** 可能形成 **dimer**



\dimers (a).

(a) Cyclobutane thymine dimer

(b) 6-4 photoproduct

Dimer 有兩種，(a) 是一般所謂 **thymine dimers** 較常見，(b)是 **6-4 鍵結**較少見

DNA 損傷:

1. 分類

- (1) strand breaks: 斷裂
- (2) base loss: 含氮鹼基缺失，會形成 AP site (猜測 depurination 可能造成此結果)
- (3) base damages: 如 deamination 會造成此結果
- (4) adducts: 如 Benzo[a]pyrene 或黃麴毒素會讓 DNA 產生 cross-link
- (5) cross-links
- (6) sugar damages
- (7) DNA-protein cross links

DNA 修復:

1. Direct repair: 直接修復壞掉的 base(較少這樣的例子且不是所有生物都有)  
而 UV 光造成的損害可以被 direct repair 是一個例子
2. Excision repair: 把壞掉的部分分解掉，然後用另一股當模板補上

DNA 損傷若不被修復:

有可能影響複製與轉錄而產生突變或導致細胞死亡

1. Coding lesions: 不會影響 DNA 複製，但有可能產生突變(例如 deamination 產生 uracil 這樣另一股原本應該是形成 G 則會變成 A 而造成突變)
2. None-coding lesion: 會影響複製(不能被複製)且可能導致 DSG(daughter - strand gaps)、DSB (double-strand breaks)

TABLE 25-5 Types of DNA Repair Systems in <i>E. coli</i>	
Enzymes/proteins	Type of damage
<b>Mismatch repair</b> Dam methylase MutH, MutL, MutS proteins DNA helicase II SSB DNA polymerase III Exonuclease I Exonuclease VII RecJ nuclease Exonuclease X DNA ligase	Mismatches
<b>Base-excision repair</b> DNA glycosylases AP endonucleases DNA polymerase I DNA ligase	
<b>Nucleotide-excision repair</b> ABC excinuclease DNA polymerase I DNA ligase	Abnormal bases (uracil, hypoxanthine, xanthine); alkylated bases; in some other organisms, pyrimidine dimers
<b>Direct repair</b> <b>DNA photolyases</b>	<b>DNA lesions that cause large structural changes (e.g., pyrimidine dimers)</b> <b>Pyrimidine dimers</b>
<b>O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase</b>	<b>O<sup>6</sup>-Methylguanine</b>
<b>AlkB protein</b>	<b>1-Methylguanine, 3-methylcytosine</b>

UV 照射造成的損壞

Table 25-5

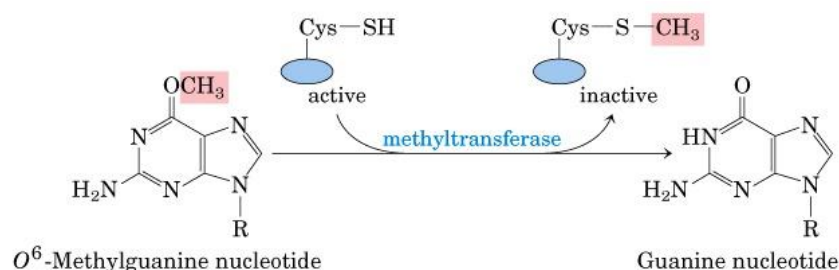
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W.H. Freeman and Company

### Direct Repair: Reversal of O6 methyl G to G by methyltransferase

又如 O<sup>6</sup>-methyl G 的例子，如果被甲基化的 G 沒被修復就很可能導致突變的發生(如右圖)。

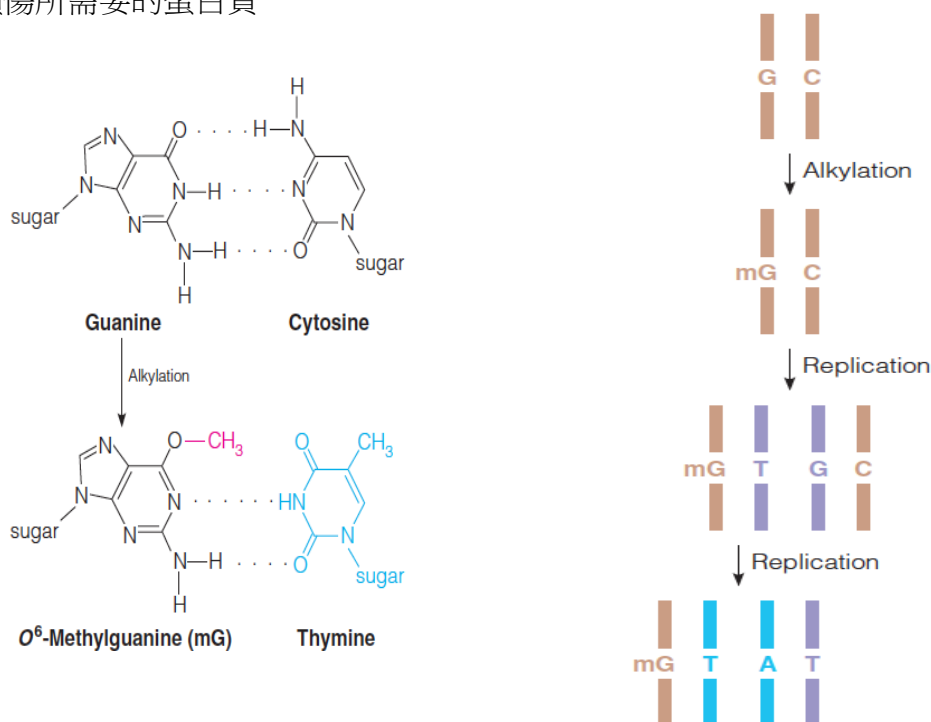
修復方法是靠 methyltransferase 這種酵素將甲基化的 G 轉換成正常的 G(如下圖)。



### Mispairing of O6-methylguanine with thymine in a DNA duplex

O<sup>6</sup>-alkylguanine 具有突變性，因為被甲基修飾過的鹼基有很高的機率會跟 Thymine 配對當修飾過的模股進行複製的時候。

1. DNA-Guanine 的烷化導致 GC → AT 的轉換
2. O<sup>6</sup>-alkylguanine alkyltransferase 為修復此種受損的酵素，從 O<sup>6</sup>-methylguanine or O<sup>6</sup>-ethylguanine 的殘基把甲基或乙基轉移到 cysteine 殘基在蛋白質的活化位
3. 被乙基化之後，鹼基配對改變導致蛋白質周轉(蛋白質在合成與分解之間的平衡)
4. 乙基化形式的 alkyltransferase 是一種特殊的 transcriptional activator，可以讓細胞適應 alkylation damage，藉由使用 alkylated protein 作為訊號以產生修復損傷所需要的蛋白質



### Photoreactivation by photolyase

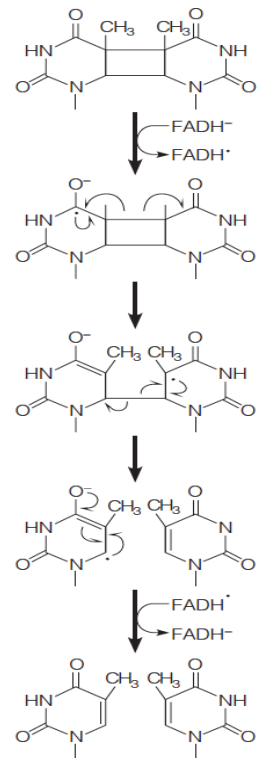
1. 此 photolyase 專門作用在環丁烷類型的 pyrimidine dimers
2. 需要色體 chromophores 例如 FAD 和 5,10-methylenetetrahydrofolate 作為 cofactors.
3. Chromophore 吸收可見光( $\approx 300\sim 400\text{nm}$ )然後將電子轉移到 dimer，打斷 pyrimidine-pyrimidine bond 藉由自由基的機制

### Nucleotide Excision Repair

當 DNA 受到大區域的扭曲或損害時，  
excinuclease(mutisubunit enzyme)會水解損害部分的兩端，並透過 DNA helicase 將受損區域直接移除之後，再經由 DNA polymerase 以及 DNA ligase 將其修復。

以大腸桿菌用 UvrABC excinuclease 修復 thymine dimers 為例

1. 一個包含 A 和 B 蛋白質的 complex 會沿著 DNA 偵測到 thymine dimers，偵測到後便停止偵測並使 DNA 彎曲

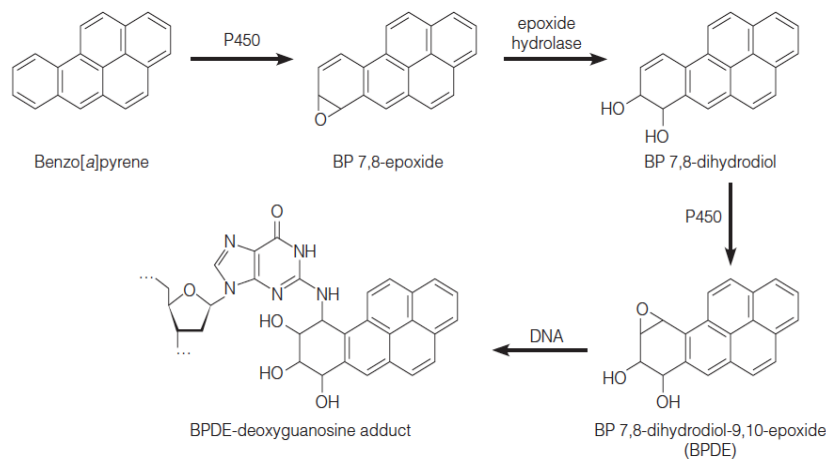


2. UvrA(一種分子媒人 molecular matchmaker)會離開使得 UvrC 會跟 B 結合
3. BC complex 會在 dimer 的受損部位左右各切一刀，切在糖苷鍵上，細菌會切出 13bps，人則是切出 29bps
4. Helicase 移除了一段包含 damage site 的 DNA 片段
5. Polymerase 和 ligase 合成新的 DNA

## BPDE-dG adduct and many bulky lesions are substrates of NER

nucleotide excision repair(NER)可以修正受損 DNA 藉由形成 bulky DNA adducts

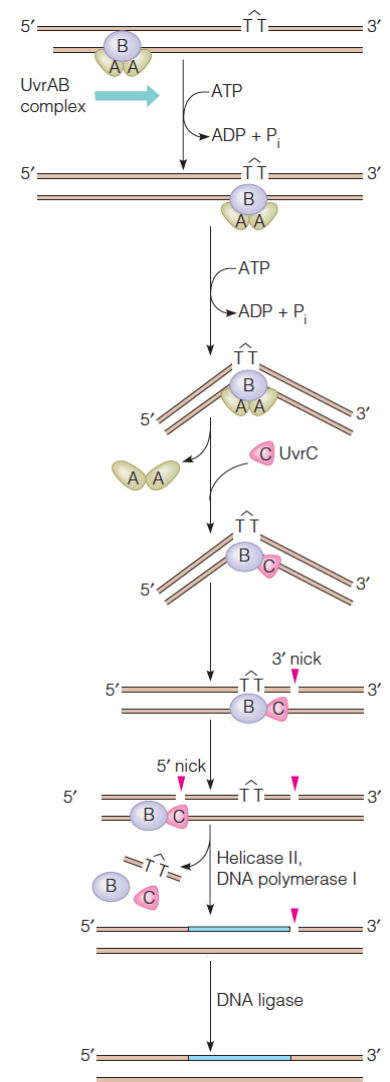
例如 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)是不完全燃燒產生的污染致癌物，其並不會直接跟 DNA 作用(說明了他們為何殘存在體內)，但其可透過 metabolic activation 或稱



biotransformation 形成 reactive electrophilic intermediate 去

結合 DNA 或 macro molecules，上圖即為 PAH metabolic activation 的例子，

BPDE 對 DNA 有高反應性，形成 bulky covalent adduct，惟並非只限跟 guanine 作用



## Base excision repair (BER)

當單一鹼基受損，如 C 或 A 被甲基化，就會被 DNA glycosylase 所辨識，並切斷其 N-glycosyl bond 而形成 AP site(sugar residue 無 purine、pyrimidine)，即圖中 CHO 那邊。

跟 NER 一樣都是切糖苷鍵

當 AP site 形成後，AP endonucleases 會切斷 5' 端的 P 及一些 nucleotides，deoxyribose-5'-phosphate 移除 AP site 的 residue 然後再經由 DNA polymerase I 取代 missing nucleotide，留下 deoxyribose-5-phosphate 在 nick 的 5' 端，接著用 DNA ligase 封住 nick，完整地修復 DNA。

DNA glycosylase 具有專一性，不同的鹼基受損會由不同的 DNA glycosylase 所辨識而切割，如：formamidopyrimidine、hypoxanthine、pyrimidine dimers 等。

BER 可以有不同的途徑，如下圖，

中:最常見如上述

左:AP lyase 水解 3' 端 repair site 的 phosphodiester bond，接著 phosphodiesterase 移除 deoxyribose-5-phosphate，產生 gap 由 DNA 聚合酶接起來

右:long-patch 可見於真核生物，DNA polymerase 催化模股的取代，使被取代的 5'-terminated "flap" 被 flap endonuclease(FEN1) 切割

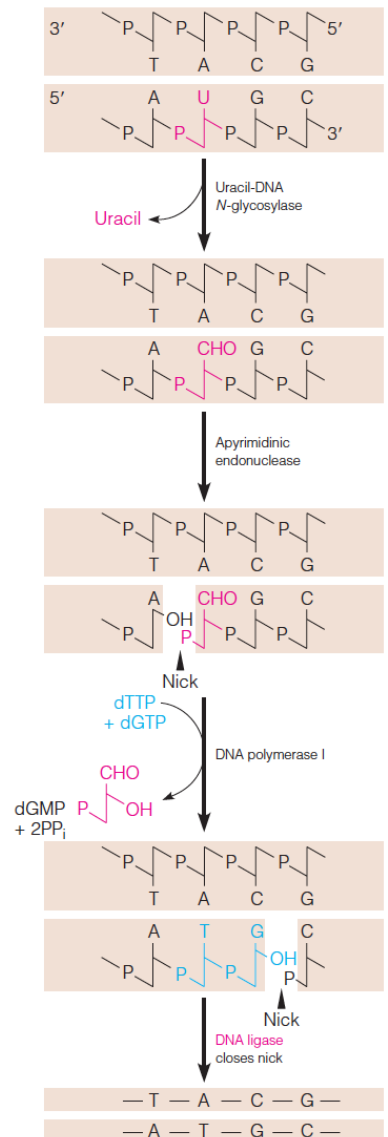
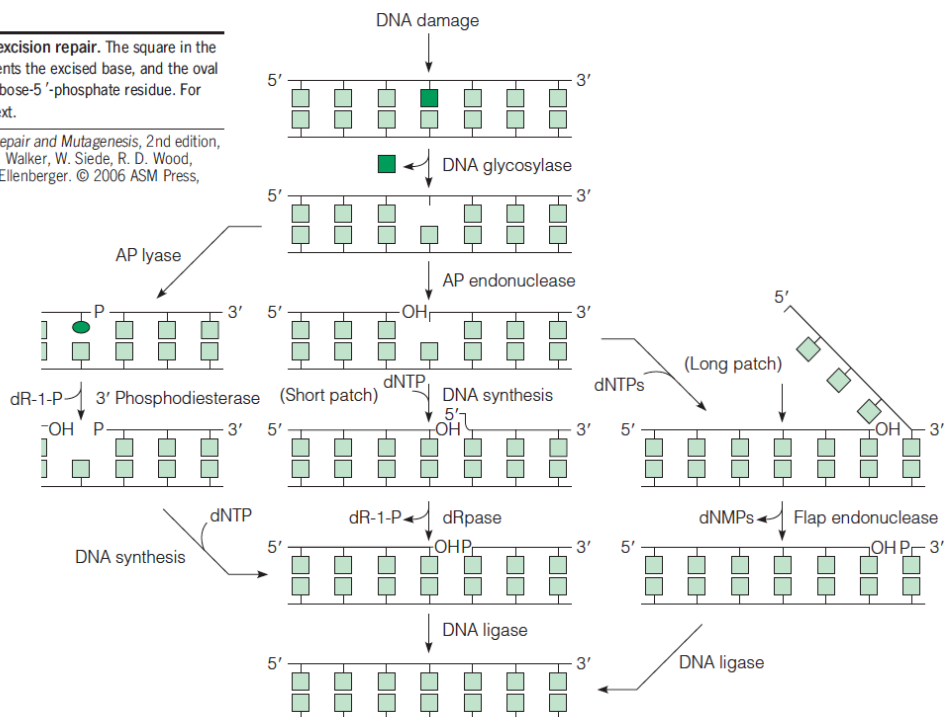


FIGURE 26.10

Pathways of base excision repair. The square in the first reaction represents the excised base, and the oval represents a deoxyribose-5'-phosphate residue. For further details see text.

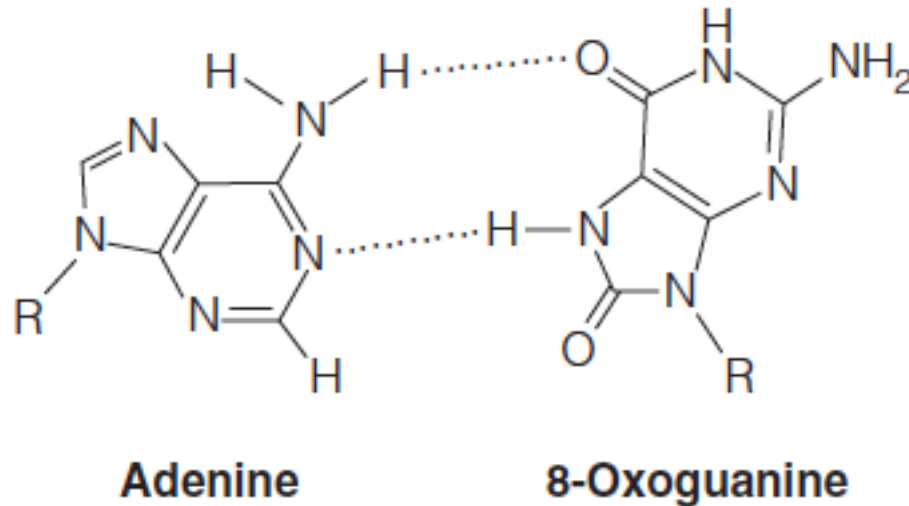
Adapted from *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edition, E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, and T. Ellenberger. © 2006 ASM Press, Washington, DC.





## Repair of oxidative damage to DNA

8-oxoguanine 是一種很常見的氧化產物因 DNA 曝露在 reactive oxidative species(ROS)所產生，它非常容易跟 Adenine 配對，這是一種 strongly mutagenic alteration。此 A-oxoG 錯誤配對是 transversion mutation(AT→CG or CG→AT)的中間產物。

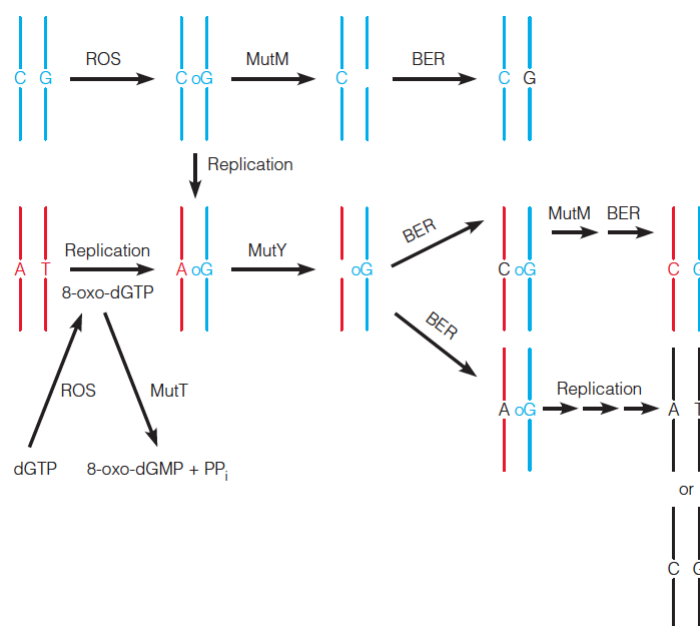


E.coli 有三種 gene 來對抗 oxidative mutagenesis，mut=某 gene 被破壞 mutation 機率 ↑ ↑ (≈100 倍):

MutT:一種 nucleotidase，水解 8-oxo-dGTP，變成 8-oxo-dGMP，防止其在 DNA replication 時作用，sanitize 細胞的 dNTP pools

MutM:把 C-G 鹼基對的 oG 切掉，進行 BER

MutY:把 A-oG 鹼基對的 A 切掉，提供更多機會來修正錯誤在下一輪複製的時候，並防止 spontaneous transversion mutagenesis



### **Methyl-directed mismatch repair in *E. coli***

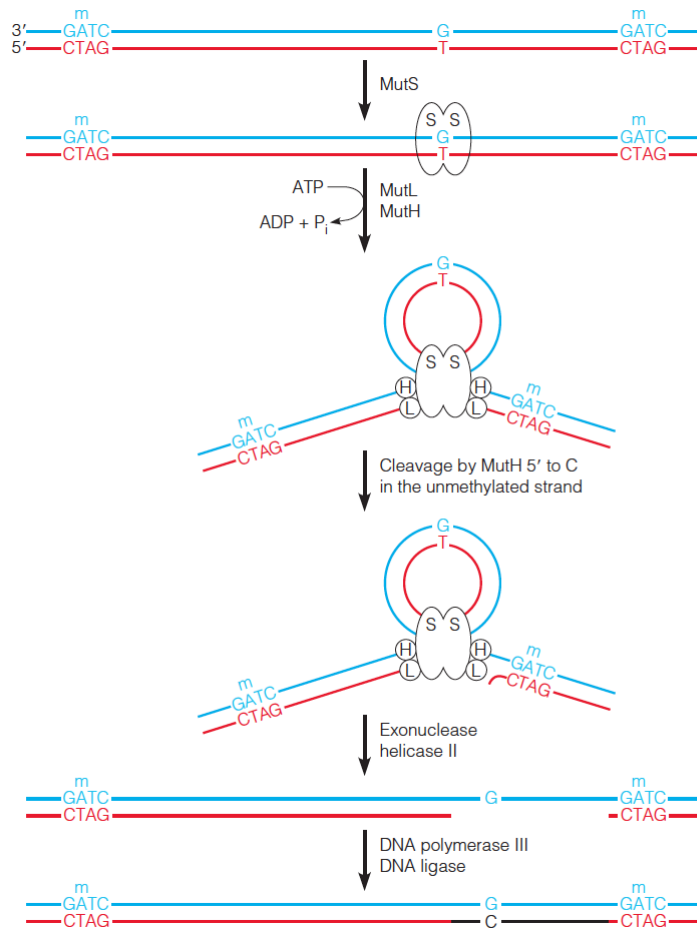
1. 當 DNA 剛複製完(尚未甲基化)而形成 mismatch 時，MutS complex 會接到 mismatch 的 DNA 上
2. 形成一 DNA loop，並不斷往兩邊拉，此時 MutH 會被活化而接到離 mistake 最近的 5'-GATC 上將未被甲基化的那股切斷
- 3.作用在 daughter strand 是因為其尚未甲基化(甲基在 A 上，由 Dam methylase 生成)

(i) 如果 mismatch 在 MutH 切去位的 5'端沒被甲基化的那一股會 3'往 5'degrading(MutH 切位→mismatch)，之後這被切下來的地方會被置換成新的 DNA 股，這過程中需要：

- DNA helicase II(解 DNA 螺旋)
- SSB(接上新的 DNA 股)
- Exonuclease I 或 Exonuclease X(degrade DNA 3'→5')
- DNA polymerase III(接上新的 DNA 股)
- DNA ligase(將新接上的 DNA 股和原股接在一起)

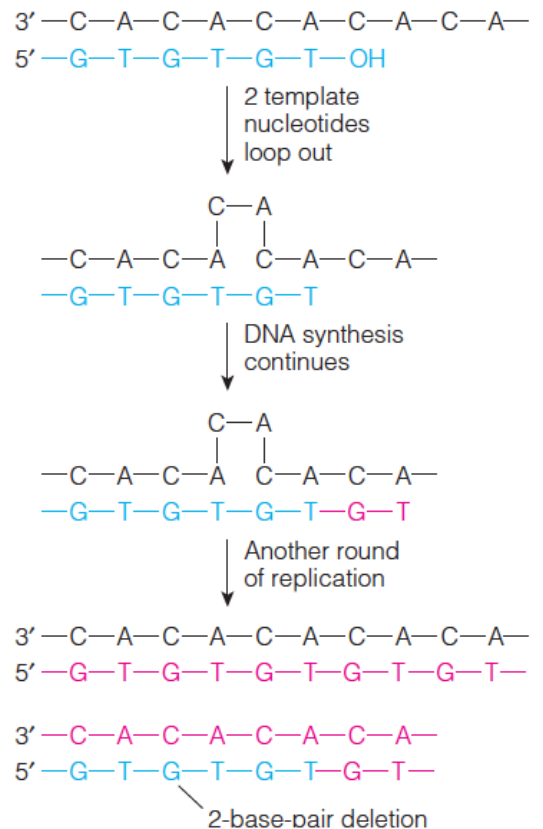
(ii) 如果 mismatch 在 MutH 切去位的 3'端沒被甲基化的那一股會 5'往 3'degrading(MutH 切位→mismatch)，過程中需要的酵素除了 exonuclease 外都和 (i)裡面的一樣，其使用的 nuclease 為：

- Exonuclease VII(degrade DNA 5'→3'或 3'→5')
- RecJ nuclease(degrade DNA 5'→3')



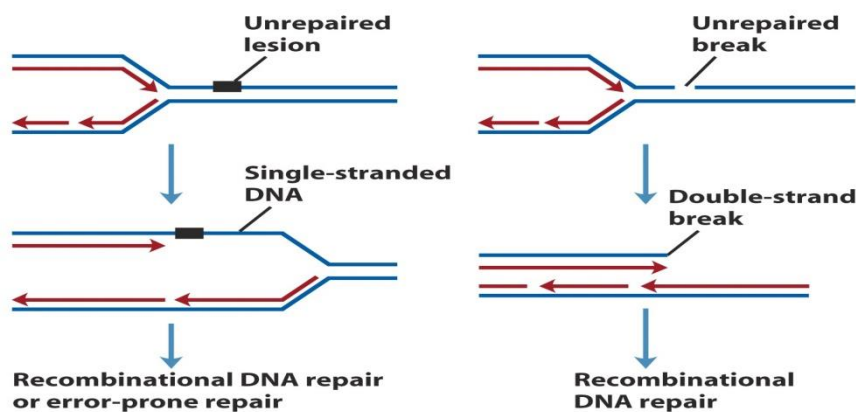
## Mismatch repair deficiency in HNPCC patients

1. Mutations in mismatch repair proteins 在遺傳易罹癌的人的 tumor cell 稱 HNPCC (heritable nonpolyposis colon cancer)
2. 有 5 種 mismatch repair proteins，hMLH1 和 hMSH2 的 defect 最常見
3. 受影響的 tumor cells 會有 microsatellite instability 的現象，在 sequence 中出現大量重複的 unit，得大腸癌的機率增加
4. template strand 或 daughter strand 都可產生 heteroduplex with a short loop，因此 skip 某些片段使得 DNA polymerase 複製大量 short repeating sequence



## Effect of DNA damage on replication

1. coding lesions：鹼基的改變，會有突變和基因影響，但不會影響複製。
2. non-coding lesions：DNA 損害，造成複製時的停止，產生 daughter-strand gaps (DSG) 或 double-strand breaks (DSB)。
3. DSG 和 DSB 可藉由 recombination process 修復



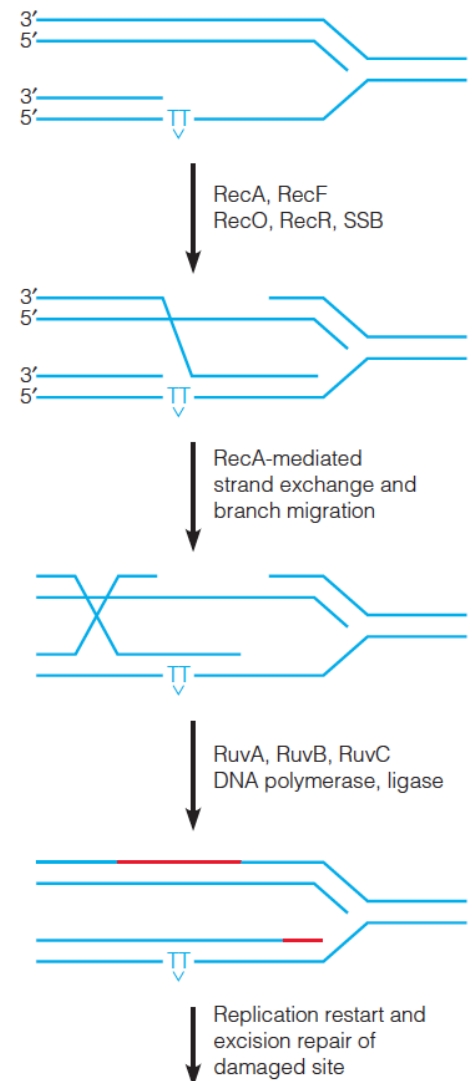
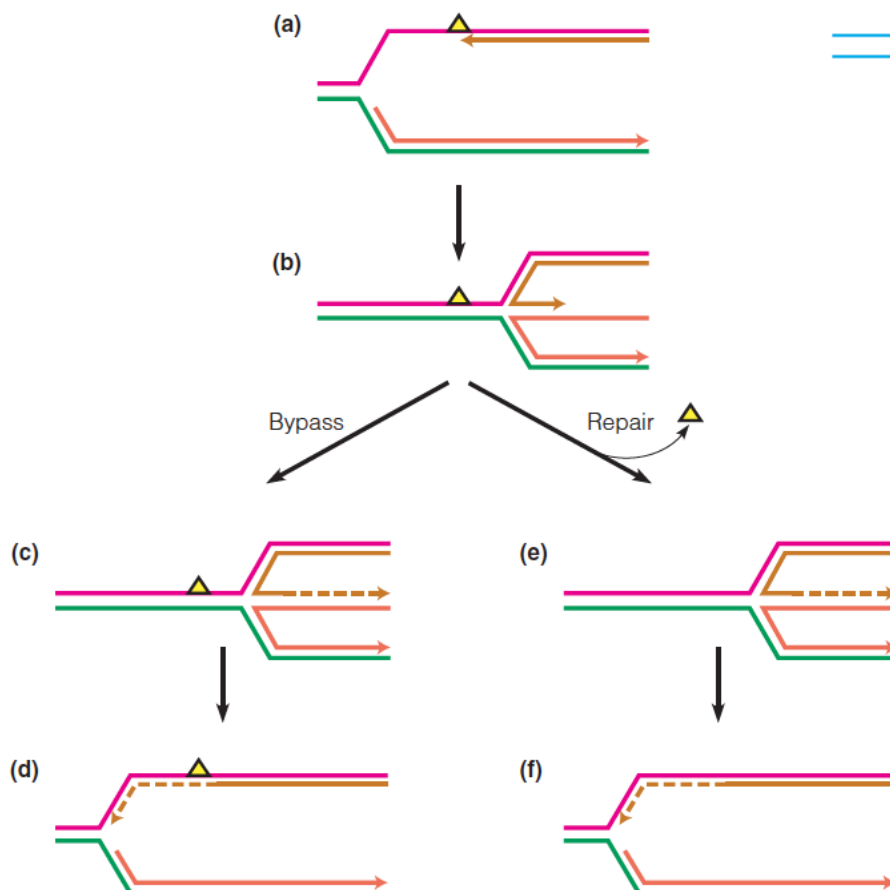
## Daughter-strand Gap Repair by recombination or translesion synthesis (SOS response)

1. 未受損的 Parental DNA strand 被轉移到 daughter strand 的 gap，gap 的形成是因為 DNA polymerase 沒辦法 replicate past it
2. 機制與 homologous recombination 近似或相同
3. SOS response 可以引來新 DNA polymerase 來進行 translesion synthesis
4. 犯錯機率高

## Repair of Stalled Replication Fork(老師說看看就好)

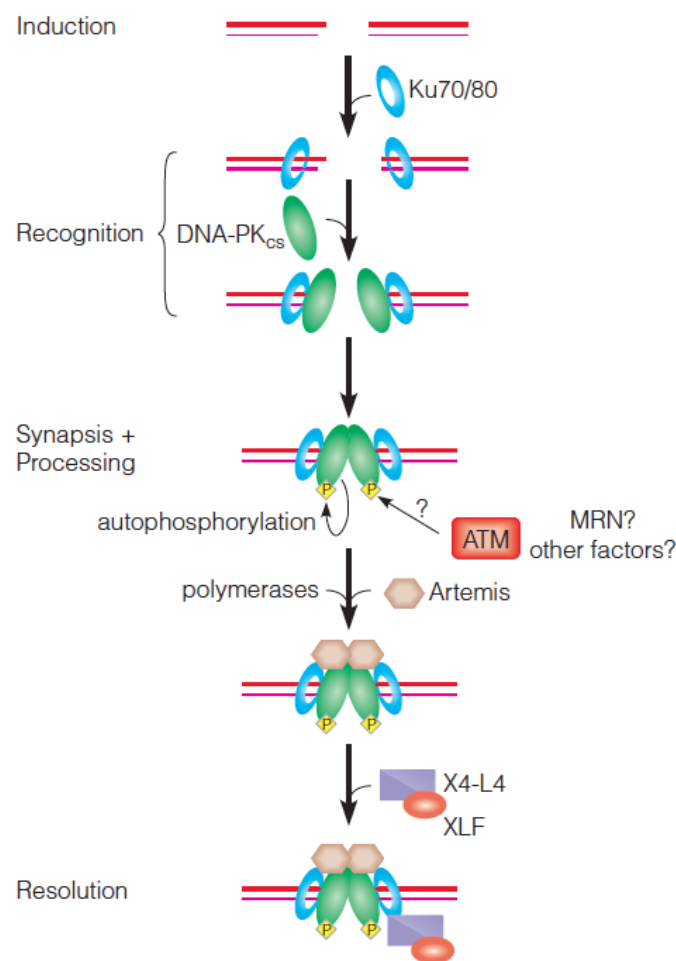
Replication fork regression 對 blocking DNA lesion 在 DNA 的領先模板股的反應

- (a), (b) 叉口倒退使 damage site 跟未受損的 template 配對
- (c), (e) 用來補充 damage strand 的 daughter strand 可以從另一 daughter strand 複製
- The fork then reforms and replication，可以重新開始複製無論 damage 有無被修復



## Repair of DNA double-strand breaks by NHEJ

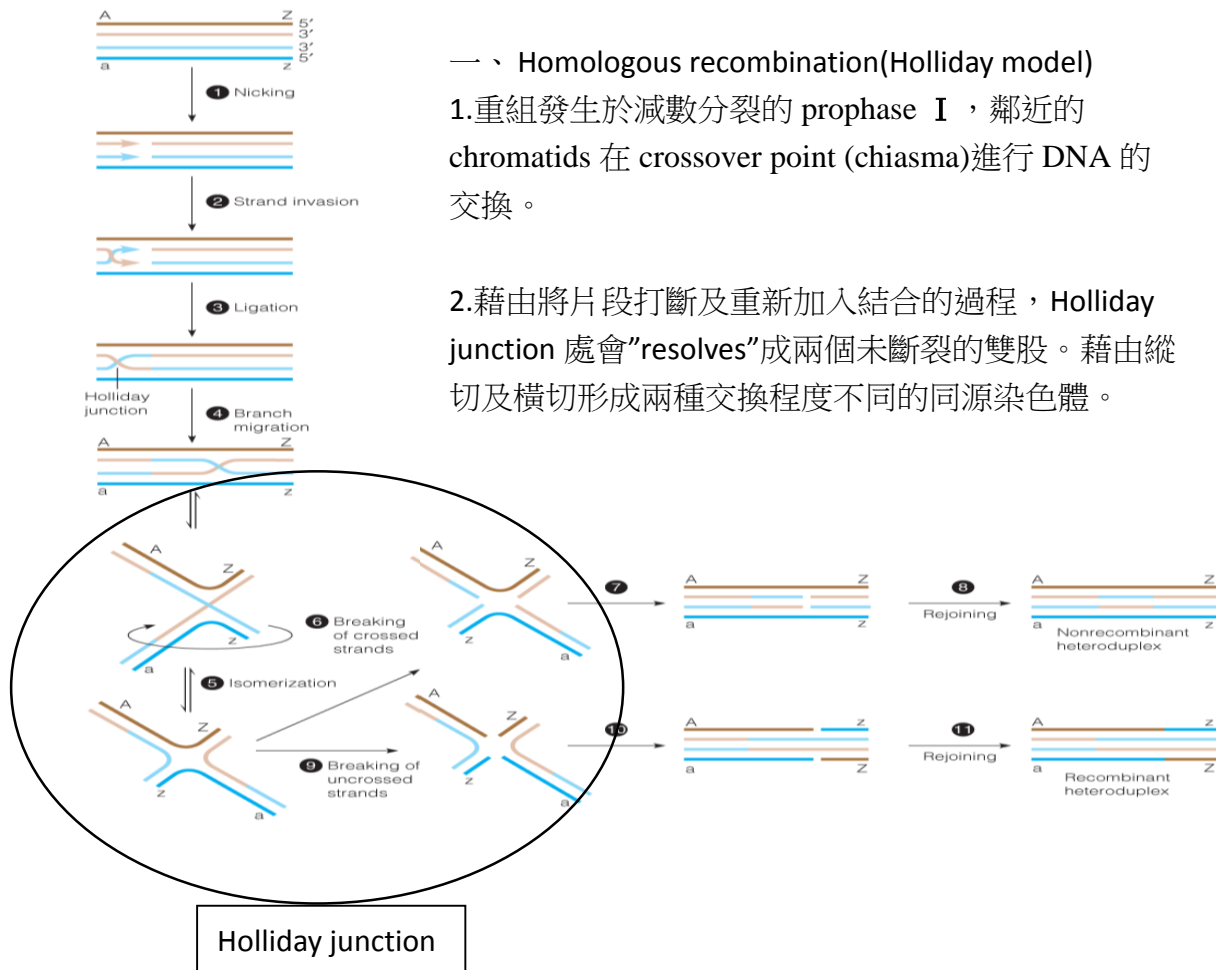
1. 雙股 DNA 斷裂可藉由 homologous recombination 或 nonhomologous end joining (NHEJ)，後者不需 DNA sequence homology 加在 DNA 的一端，較有效率但較不 precise
2. 兩者皆由 signaling protein 接在 severed ends 開始，脊椎動物中最重要的就是 ATM
3. HR&NHEJ 前期都是先磷酸化 H2AX(H2 histone 的 variant form)在 nucleosome 差不多要斷裂的時候，標的位置是 Ser-139，在 histone 的 C 端尾。這是 chromatin remodel 的一部份，幫助 core particle 移動，使 DNA 端暴露以加工
4. Ku70/80 是一 heterodimeric protein(一個 70kDa 另一個 80kDa)接在斷裂 DNA 的 each severed ends
5. 進行 additional end processing，產生一個 synapse，使兩端能夠接合，藉由 DNA Ligase IV
6. 真正機制目前尚未十分了解，大致如圖



## DNA Recombination

DNA 的重組可發生在同一染色體內或不同染色體間，於 DNA 修復、減數分裂以及產生生物多樣性中扮演重要的角色，可分為三大類：

1. Homologous recombination：參與重組的 DNA 片段有高度相似的序列，常見於細胞的減數分裂與 DNA 修復。
2. Site-specificity recombination：重組的區域限於特定序列。
3. DNA transposition：特定 DNA 片段在染色體上位置的移動。
4. Illegitimate recombination：非前三類的總稱，機制不明



### 一、Homologous recombination(Holliday model)

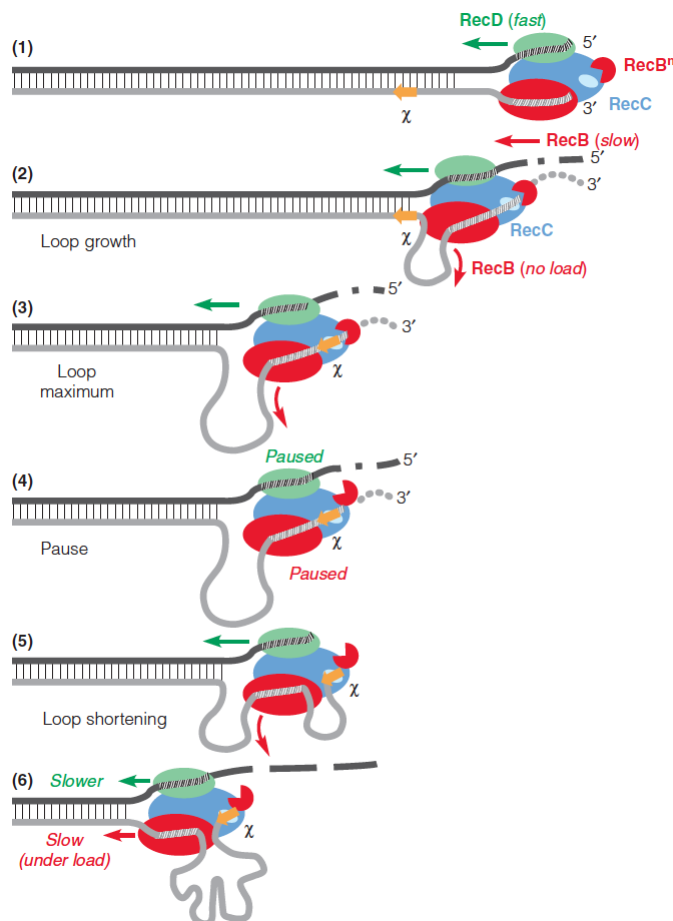
1.重組發生於減數分裂的 prophase I，鄰近的 chromatids 在 crossover point (chiasma)進行 DNA 的交換。

2.藉由將片段打斷及重新加入結合的過程，Holliday junction 處會“resolves”成兩個未斷裂的雙股。藉由縱切及橫切形成兩種交換程度不同的同源染色體。

Meselson-Radding model for homologous recombination 老師說不重要

3. Recombination 中所需之酵素(以 E. coli 為例)：

- I. **RecBCD enzyme**：由三個 polypeptides RecB、RecC 以及 RecD 所形成的一個 complex，同時具有 helicase(RecB、RecD)與 nuclease 兩種酵素的機能。在 DNA 的末端利用 helicase 的活性解開雙股，再利用 nuclease 的活性分解 DNA，RecB(3'→5')RecD(5'→3')，RecD 的活性比 RecB 的活性強，一直到 RecC subunit 與 **chi(x 處) sequence**(5' GCTGGTGG)結合後，造成酵素活性的改變，產生 ssDNA loop，使之只分解 5' terminus，形成末端為 3' OH 的單股 DNA。

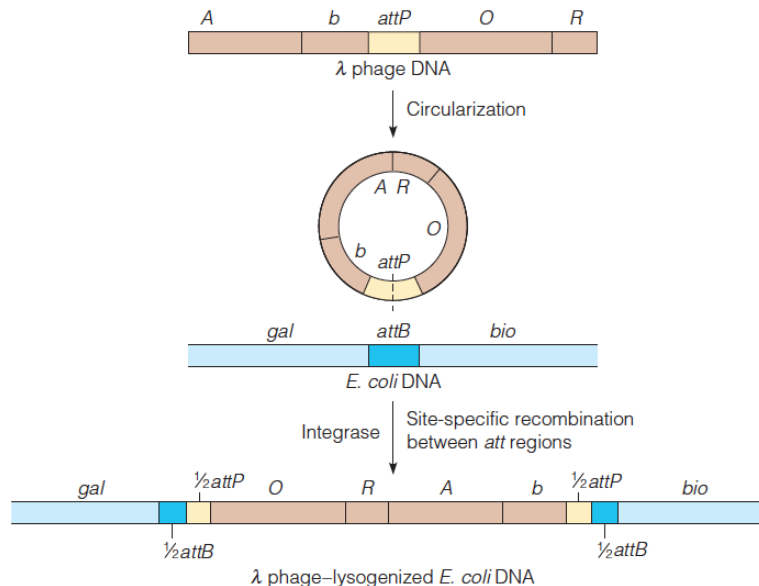


- II. RecA promotes joint molecule formation and strand exchange：  
結合在 single-stranded 或 gapped DNA 上的 RecA 可使其靠近 homologous duplex DNA，進行 strand exchange，過程中需要 ATP 的水解。  
RecA 先在單股上形成 filament，接著與 homologous duplex 形成一個 three-stranded pairing intermediate，最後其中一股會與原先單股結合，另一股則被取代釋出，過程中亦需 ATP 的水解。
- III. RuvABC: RuvA 和 Holliday junction 有很高的親和力，RuvB 藉由水解 ATP 來完成 branch migration 形成 heteroduplex DNA，RuvC 則 resolves Holliday junction 成為 recombinant products



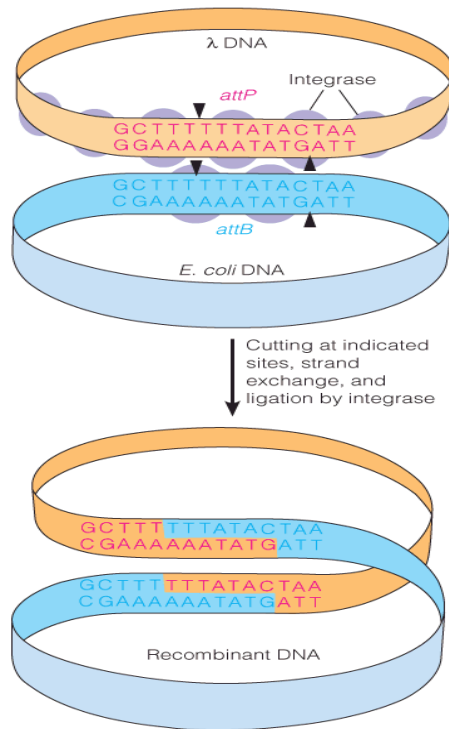
## 二.Site-specific recombination

用特定的酵素,在特定的 DNA sequence,以 Bacteriophage lambda integration in *E. coli* 為例:



噬菌體的片段鑲嵌入宿主中，和宿主長時間共生而不使宿主死亡，表示這種噬菌體有溶原性，稱作溫和噬菌體。lambda phage DNA 片段會環化，藉由酵素 integrase 噬菌體的 attP 會和細菌的固定片段 attB 相連接。

### Integration of bacteriophage lambda:

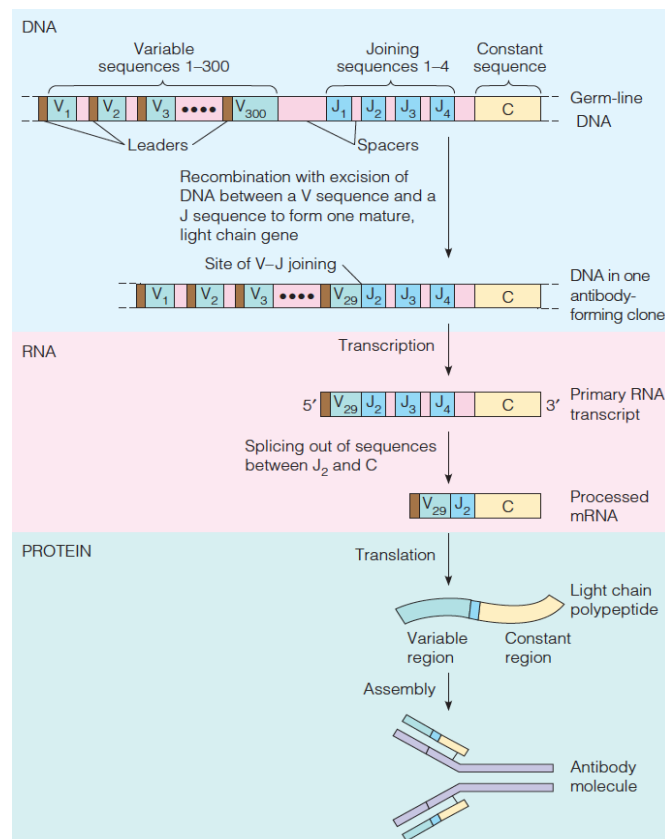


(b)

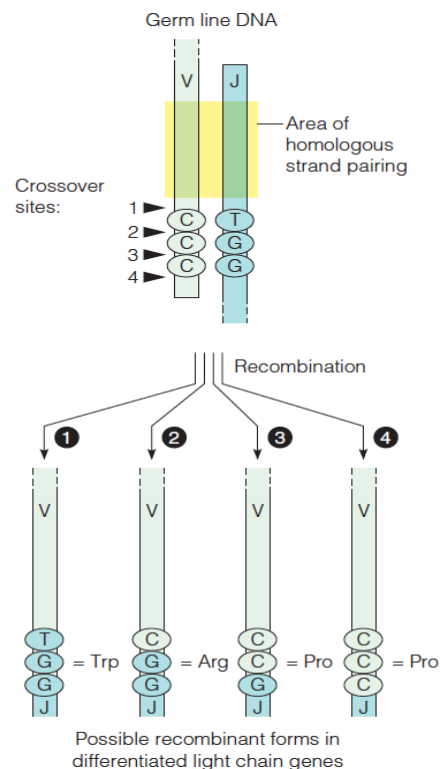
1. Site-specific recombination 需要兩種蛋白質: Int, IHF
2. IHF 結合在特定的位置可以使片段形成超螺旋，促使 Int 接鄰近的位置。
3. Int 可以切割，使七個核苷酸重疊，在交換的過程中產生 Holliday junction，產生兩個同時具有噬菌體跟細菌 DNA 的混和序列。

## VDJ recombination of immunoglobulin gene:

IgG 抗體的 light chain 基因有 V region 約 300 種，J region 則有 4 種，在成熟過程中，中間的部分由 **recombination** 切除後才可形成成熟的基因，進而轉錄出特定的抗體(V 在上游 5'，J 在下游 3')



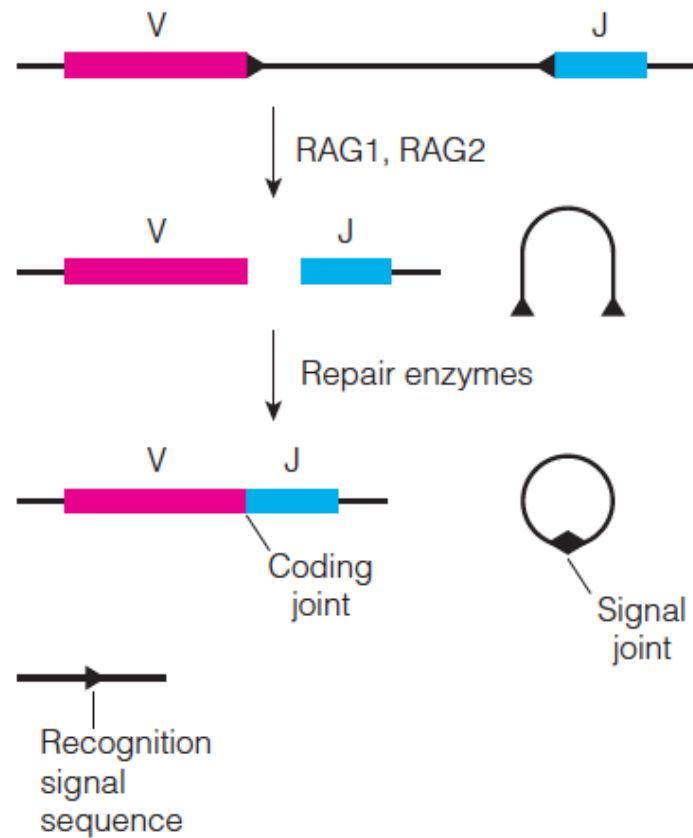
切割與修飾會發生在 V 和 J 之間的 terminal trinucleotide 片段，如此可以增輕鏈的多樣性變成 2.5 倍(300x4x2.5 VxJx2.5)



加

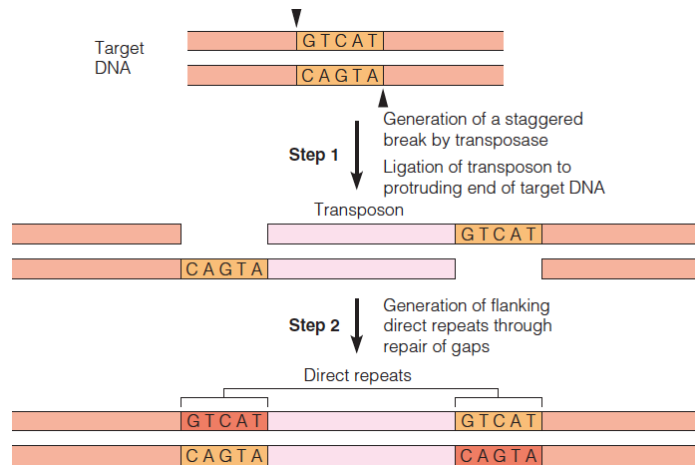
V(D)J Recombination 的切割方式：

1. 用到 RAG1 RAG2
2. 單骨斷裂，中間會形成一個 hairpin bends
3. Hairpin bends 被拿掉，double strand break repair



Transposition:

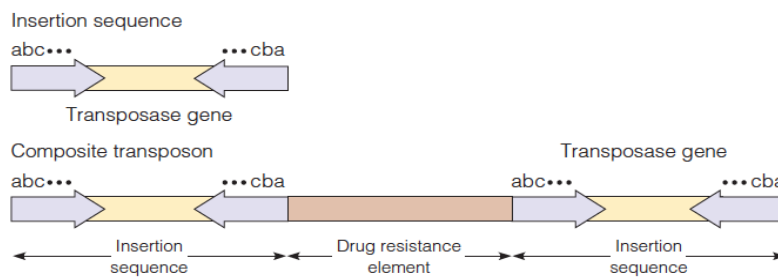
1. 特定的一個 DNA 片段有能力在染色體上移動，藉由 transposable elements 或 transposons(約 1000~3400bps)，而 transposon 兩邊的序列通常是 inverted repeat (terminal repeat)
2. 最簡單 transposable element 則稱為 IS(insertion sequences)
3. Transposition 特點: duplication of direct repeats(5-9bps)，在插入處的兩邊序列是一樣的
4. 可能透過 RNA intermediate，即是先轉錄出一個 Mrna 再透過反轉錄酶，合成 DNA，但老師說這裡不是課堂的重點。



5.重點:在 DNA transposition 的機制主要有兩種

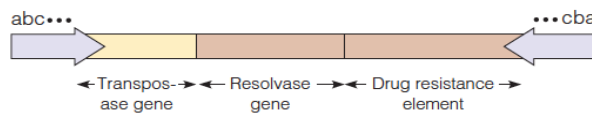
- A. Direct Transposition: 在 transposon 跳到另一個位置後,原來這個位置的 transposon 序列即不見了。
- B. Replicative Transposon: 則是 transposon 在跳到另一位置後原先位置上的 transposon 仍在。

#### CLASS I



原本不見

#### CLASS II



原本仍在

#### CLASS III

