



重覆性三核甘酸過失性合成之研究

Slippage Synthesis of Triplet Repeat Sequences

計畫編號：NSC 88-2314-B-041-001

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：吳明娟 嘉南藥理學院食品衛生系

八十六年度及以前的一般國科會專題計畫(不含產學合作研究計畫)亦可選擇適用，惟較特殊的計畫如國科會規劃案等，請先洽得國科會各學術處同意。

一、中文摘要

重覆性三核甘酸(TRS)的不正常複製延長與好幾個人類的遺傳疾病相關。目前造成重覆性三核甘酸(TRS)過失性合成(slippage synthesis)的機制仍未完全了解；但是由於TRS複製的不穩定性與其長度有關，因此一般認為過失性合成是由TRS的不正常二級結構所引起。本研究乃利用試管內聚合酵素反應作為間接測量形成髮夾結構的能力強弱的簡單方法。形成髮夾結構的能力越強者，複製延長的能力越強，也暗示可能有引起活體內的過失性合成的潛力。我們發現：(a)不同順序的單股TRS，其複製延長能力不同 (b)含中斷順序之單股及雙股TRS的複製延長速率較連續的TRS為緩。

關鍵詞：重覆性三核甘酸、過失性合成、

Abstract

The expansion of triplet repeat sequence (TRS), CAG/CTG, CGG/CCG or GAA/TTC, on certain chromosome is associated with several human hereditary neuromuscular and neurodegenerative diseases. It is generally accepted that multiple slippage synthesis accounts for the instabilities of TRS. The mechanisms for slippage synthesis remain unclear, but the dependence of expansion on repeat length suggests the involvement of unusual secondary structures. In this report, we presented an in vitro polymerase-driven protocol for indirect assay for the propensity of hairpin conformation of a single-stranded TRS. We found that the amplification pattern varied dramatically for TRS with different sequences. In addition, the interruptions in TRS decreased the amplification efficiency,

indicating the interruptions either destabilizing the hairpin conformations or forming a secondary structure which is unfavorable for DNA polymerase.

Keywords: triplet repeat sequence, slippage synthesis, hairpin structure

二、緣由與目的

重覆性三核甘酸(TRS)的不正常複製延長與好幾個人類的遺傳疾病相關[1-6]。目前已知：五個脆裂染色體位置是由於CGG/CCG不穩定重複所造成；也有九種遺傳的神經系統疾病是由於CAG/CTG不正常複製引起；而Friedreich's ataxia則是因為GAA/TTC不穩定重複所造成。上述這些疾病除了Friedreich's ataxia外，皆有一遺傳特徵，稱為anticipation，即下一代比上一代發病年齡更早且病症更嚴重[7-14]。

目前造成重覆性三核甘酸(TRS)過失性合成(slippage synthesis)的機制仍未完全了解；但是由於TRS複製的不穩定性與其長度有關，因此一般認為過失性合成是由TRS的不正常二級結構所引起[15]。目前也有許多生物物理及生化研究結果支持上述假說：雙股的TRS會形成non-B-DNA結構[16, 17]；單股TRS則會形成股內(intrastrand)髮夾(hairpin)結構[18-27]；其他結構：例如quadruplexes[28, 19]及triplexes[30]，也有文獻記載。在這些結構中以在複製叉(replication fork)的遲滯股(lagging strand)的髮夾結構最被認為是引起複製時過失性合成的主要原因[31]。最近過失性DNA(slipped DNA)結構已被證實存在：利用reduplex $d(\text{CGG})_n/d(\text{CTG})_n/d(\text{CAG})_n$ ，Pearson及Sinden以電泳及電子顯微鏡發現S-DNA

(slipped strand DNA) 存在, 此結構也是由於股內髮夾結構所形成[32, 33]。

早在六零年代, Kornberg 即發現 E. coli DNA 聚合酵素以寡核⁺⁺苷酸為模板(template) 進行催化複製時, 有過失性合成的現象[34]。近幾年來更發現, 除了 E. coli DNA 聚合酵素外, 原核生物中所分離的 Taq DNA 聚合酵素, T7 DNA 聚合酵素, Sequenase, T4 DNA 聚合酵素, 以及真核生物中所分離的 DNA 聚合酵素- α , DNA 聚合酵素- β , HIV-反轉錄酵素也會產生過失性合成(slippage synthesis) 的現象; 換句話說, TRS 在試管中會不正常複製延長, 其中尤以 Taq DNA 聚合酵素效果最明顯[35,36]。Behn-Krappa 及 Doerfler 更發現在無模板存在下, 高 GC 含量的寡核⁺⁺苷酸, 例如:單股的(CGG)17, (CGG)12, (GCC)17, (CG)25, (CTG)17 及雙股的(CAG)17/(GTC)17 皆可利用 Taq DNA 聚合酵素加以複製延長[37]。

正常人的 TRS 常含有中斷順序(interrupted sequence) 例如: FMR-1 的(CGG) n 中夾雜數個 AGG [38]; SCAI gene 的(CAG) n 中夾雜數個 CAT [39]; Huntington disease gene 的(CAT) n 中倒數第二為 CAA [40]; MJD gene 的(CAG) n 中夾雜數個 CAA 及 AAG [41]; frataxin gene 的 GAA-Alu 中夾雜數個(GAGGAA) [42]。這些中斷順序(interrupted sequence) 增加遺傳的穩定度, 因此含中斷順序的 TRS 較不易產生過失性合成(slippage synthesis) 的現象。一旦失去中斷順序, 亦即變成純的長股 TRS, 則易引起遺傳的不穩定, 造成疾病。因此中斷順序被認為當作 anchors 以防止 DNA 聚合酵素的過失性合成; 或者會妨礙促進延長的二級結構的產生。最近 Pearson 等人發現含 CAT 中斷順序的(CAG) n 及含 AGG 中斷順序的(CGG) n 的 S-DNA (slipped strand DNA) 的形成能力遠比不含中斷者弱 [43]。

本研究係依據 Behn-Krappa 及 Doerfler 的研究法, 利用 Taq DNA 聚合酵素及 Klenow DNA 聚合酵素, 探討在無模板存在下, 不同順序的單股及雙股 TRS 及含中

斷順序 TRS 之過失性合成效率之差異。我們更進一步分析部分單股 TRS 過失性合成的產物以期建立試管內過失性合成的機制。在研究的最後一部分, 我們試圖以非變性聚丙烯醯基膠電泳分析 TRS 的二級結構, 並將其結果與試管內過失性合成結果作比較。

三、結果與討論

(1) 利用 Taq DNA 聚合酵素探討在無模板存在下, 不同順序的單股 TRS 過失性合成效率之差異 (partially published in ref 44)

我們仿 Behn-Krappa 及 Doerfler 的方法, 將 20 個長度相同但順序不同的單股 TRS 寡核⁺⁺苷酸, 分別在三個不同 annealing 溫度:48°C, 55°C, 62°C, 進行 PCR 反應, 以探討在無模板存在下, 不同順序的單股 TRS 過失性合成效率之差異。結果如表一所示:

表一、長度相同但順序不同的單股 TRS 寡核⁺⁺苷酸在三個不同 annealing 溫度:48°C, 55°C, 62°C, 進行 PCR 反應結果

Table 1 Summary of PCR amplification with different TRS oligonucleotides under three different annealing temperatures

Oligomer ^a	48°C	55°C	62°C
(GAA)17	- ^b	-	-
(TTC)17	+ ^c	+	-
(CAG)17	+	+	+
(CTG)17	++ ^d	++	++
(CGG)17	-	-	-
(CCG)17	++	++	++
(AAT)17	-	-	-
(ATT)17	-	-	-
(TAG)17	++	++	++
(CTA)17	++	++	++
(CAA)17	-	-	-
(TTG)17	++	++	++
(ATG)17	+	-	-
(CAT)17	++	++	++
(TGG)17	++	++	++
(CCA)17	-	-	-
(GAC)17	++	++	++
(GTC)17	++	++	++
(AGG)17	-	-	-
(CCT)17	-	-	-

^a 反應濃度為 200ng/50 μ l reaction volume

^b 無產物形成

^c 僅少量產物形成

^d 多量產物形成

單股 TRS 過失性合成的結果與預期差異頗大: (1) 一些不含股內互補順序的單股 TRS, 包括 (TTC)₁₇, (TTG)₁₇, (TGG)₁₇ 亦可進行過失性合成; 然而其互補股 (GAA)₁₇, (CAA)₁₇, (CCA)₁₇ 及另兩個不含股內互補順序的 (AGG)₁₇, (CCT)₁₇ 皆無過失性合成發生。推測可能的原因是 pyrimidine-rich 股比 purine-rich 股形成髮夾結構的空間阻力較小所致。另一可能原因則為在多次加熱降溫過程中 T:T mismatch 形成的穩定性大於 A:A mismatch 或 C:C mismatch。或者是 T:G 間亦形成互補結構但是 A:C 卻無法(2)含股內互補順序的單股 TRS, 包括 (CGG)₁₇, (AAT)₁₇, (ATT)₁₇, (ATG)₁₇ 並無過失性合成發生。究竟純粹是這些順序的二級結構決定反應發生與否還是酵素的獨特性質影響?

(2) 部分 (TTC)₁₇ 過失性合成的產物的 DNA 順序分析

由上述結果我們訝異地發現一些不含股內互補順序的單股 TRS 亦可進行過失性合成 (eg. (TTC)₁₇, (TGG)₁₇)。我們極欲知道這些 TRS 究竟是以何種機制進行複製延長, 因此將 (TTC)₁₇ 過失性合成的產物 subcloning 到 TA cloning vector 再以兩旁的引子做 DNA 順序分析。結果發現無論 subclone 片段與 ORI 之間的方向為何, E. coli 培養代數越多, 重複片段長度遞減, 可見在生物體中亦有 TRS 過失性合成。當我們分析 (TTC)₁₇ 的過失性合成的雙股產物的順序時發現皆為 (TTC)₇TTT(TTC)TTA(TTC)₃TT(GAA)_n。顯示所有的單股 TTC 過失性合成都是由同一機制產生; 但確實合理的機制仍無法由產物的順序推斷出。

(3) 探討中斷順序對過失性合成的影響 (in preparation)

在本單元中, 承繼上述的研究模式探討以下各寡核糖酸: (GAA)₁₀, (TTC)₁₀, (GAA)₁₇, (TTC)₁₇, (CAG)₁₂, (CTG)₁₂,

(CAG)₁₇, (CTG)₁₇, (CGG)₁₀, (CCG)₁₀, (CGG)₁₇, and (CCG)₁₇; 及含中斷順序的 (GAA)₁₀GAG(GAA)₆ (又名 GAAan), (TTC)₆CTC(TTC)₁₀ (又名 TTCan), (CAG)₁₂CATCAGCAT(CAG)₅ (又名 CAGan), (CTG)₅ATGCTGATG(CTG)₁₂ (又名 CTGan);

(CTG)₁₂ATGCTGATG(CTG)₅ (又名 CTGan), (CGG)₁₀AGG(CGG)₆ (又名 CGGan), 及 (CCG)₆CCT(CCG)₁₀ (又名 CCGan) 在試管內以 Taq DNA 聚合酵素及 Klenow DNA 聚合酵素催化複製延長能力之差異。我們發現: 中斷順序不僅降低單股 TRS 的複製能力, 此外也減緩雙股 TRS 的複製速率。這暗示中斷順序可能影響髮夾結構的形成; 或者含中斷順序的結構, 在熱力學上不為 Taq DNA 聚合酵素及 Klenow DNA 聚合酵素喜歡。

(4) 以非變性聚丙烯醯基膠電泳分析 TRS 的二級結構

為進一步探討中斷順序對 TRS 寡核糖酸二級結構影響, 我們以聚丙烯醯基膠電泳泳動分析 (electrophoretic mobility melting profile): 利用含 TRS 的單股 DNA 在不同溫度的非變性聚丙烯醯基膠電泳中泳動速度不同, 可建構一個 electrophoretic mobility melting profile (EMMP)。當非變性聚丙烯醯基膠電泳溫度高時, 單股 DNA 的股內髮夾結構會被破壞, 造成泳動速度變慢。不同的單股 TRS 的股內髮夾結構穩定度不同, 即熔點 (T_m) 不同, 所以 EMMP 也不同。我們初步的結果顯示, 只有大的中斷順序會改變 EMMP (eg. (CAG)_{an} vs. (CAG)₁₇ 及 (CTG)_{an} vs. (CTG)₁₇); 其餘由單一核糖酸改變所形成的中斷順序對二級結構的影響並無法以此法測出。因此, 上述中斷順序會改變試管內的過失性合成速率的現象並無法以純粹髮夾結構的安定性來解釋。

四、計畫成果自評

本研究初步探討試管內 TRS 過失性合成機制之模式, 可增進對人體 TRS 不正常複製延長的了解。研究成果與計畫要求完

全允合，除原已發表於 BBA[38]的一篇論文外現正著手整理其餘數據準備投稿。

五、參考文獻

1. S. Yu, M. Pritchard, E. Kremer, M. Lynch, J. Nancarrow, E. Baker, K. Holman, J. C. Mulley, S. T. Warren, D. Schlessinger, G. R. Sutherland, R. I. Richards, Science 252 (1991) 1179-1181.
2. A. J. M. H. Verkerk, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y.-H. Fu, et. al, Cell 65 (1991) 905-914.
3. C. T. Jr. Ashley, S. T. Warren, Annu. Rev. Genet. 29 (1995) 703-728.
4. H. L. Paulson, K. H. Fischbeck, Annu. Rev. Neurosci. 19 (1996) 79-107.
5. V. Campuzano, L. Montermini, M. D. Molto, L. Pianese, et. al, Science 271 (1996) 1423-1427.
6. S. T. Warren, Science 271 (1996) 1374-1375.
7. S. T. Warren, C. T. Jr. Ashley, Annu. Rev. Neurosci. 18 (1995) 77-99.
8. G. Bates, H. Lehrach, Bioessays 16 (1994) 277-284.
9. G. R. Sutherland, R. I. Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995) 3636-3641.
10. S. Panzer, D. P. A. Kuhl, C. T. Caskey, Stem Cells 13 (1995) 146-157.
11. R. I. Richards, G. R. Sutherland, Hum. Mutat. 8 (1996) 1-7.
12. R. D. Wells, J. Biol. Chem. 271 (1996) 2875-2878.
13. G. Bates, Bioessays 18 (1996) 175-178.
14. S. Tsuji, Intern. Med. 36 (1997) 3-8.
15. R. Cox, S. M. Mirkin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 5237-5242.
16. Y. Kohwi, H. Wang, T. Kohwi-Shigematsu, Nucleic Acids Res. 21 (1993) 5651-5655.
17. A. Bacolla, R. Gellibolian, M. Shimizu, S. Amirhaeri, S. Kang, K. Ohshima, J. E. et. al, J. Biol. Chem. 272 (1997) 16783-16792.
18. X. Chen, S. V. Mariappan, P. Catasti, R. Ratliff, et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995) 5199-5230.
19. A. M. Gacy, G. Goellner, N. Juranic, S. Macura, et. al, Cell 81 (1995) 533-540.
20. S. V. Mariappan, P. Catasti, X. Chen, R. Ratliff, R. K. Moyzis, et. al, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 784-792.
21. S. V. Mariappan, P. Catasti, G. Gupta, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 775-783.
22. M. Mitas, A. Yu, J. Dill, I. S. Haworth, Biochemistry 34 (1995) 12803-12811.
23. M. Mitas, A. Yu, J. Dill, T. J. Kamp, et. al, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 1050-1059.
24. A. Yu, J. Dill, S. S. Wirth, G. Huang, et. al, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 2706-2714.
25. A. Yu, J. Dill, M. Mitas, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 4055-4057.
26. J. Petruska, N. Arnheim, M. F. Goodman, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 1992-1998.
27. G. K. Smith, J. Jie, G. E. Fox, X. Gao, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 4303-4311.
28. M. Fry, L. A. Loeb, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (1994) 4950-4954.
29. A. Kettani, R. A. Kumar, D. J. Patel, J. Mol. Biol. 254 (1995) 638-656.
30. V. V. Kuryavyy, T. M. Jovin, Nature Genet. 9 (1995) 339-341.
31. R. R. Sinden, R. D. Wells, Curr. Opin. Biotechnol. 3 (1992) 612-619.
32. C. E. Pearson, R. R. Sinden, Biochemistry 35 (1996) 5041-5053.
33. C. E. Pearson, Y.-H. Wang, J. D. Griffith, R. R. Sinden, Nucleic Acids Res. 26 (1998) 816-823.
34. A. Kornberg, L. L. Bertsch, J. F. Jackson, H. G. Khorana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51 (1964) 315-323.
35. C. Schlotterer, D. Tautz, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 211-215.
36. J. Ji, N. J. Clegg, K. R. Peterson, A. L. Jackson, et. al, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 2835-2840.
37. A. Behn-Krappa, W. Doerfler, Hum. Mutat. 3 (1994) 19-24.
38. N. Zhong, W. Yang, C. Dobkin, W. T.

- Brown, Am. J. Hum. Genet. 57 (1995)
351-361.
39. M. Y. Chung, L. P. W. Ranum, L. A.
Duvick, A. Servadio, et. al, Nat. Genet. 5
(1993) 254-258.
40. Y. P. Goldberg, C. T. McMurray, J.
Zeisler, E. Almqvist, et. al, Hum. Mol.
Genet. 4 (1995) 1911-1918.
41. Y. Kawaguchi, T. Okamoto, M.
Taniwaki, M. Aizawa, et. al, Nature
Genet. 8 (1994) 221-227.
42. L. Motermini, E. Andermann, M.
Labuda, A Richter, et. al, Hum. Mole.
Genet. 6 (1997) 1261-1266.
43. C. E Pearson, E. E. Eichler, D.
Lorenzetti, S. F. Kramer, et. al,
Biochemistry 37 (1998) 2701-2708.
44. M. -J. Wu, L. -W. Chow, M. Hsieh,
Biochim. Biophys. Acta 1407 (1998)
155-162.

