

* 专题评述 *

真核生物 DNA 聚合酶 δ 的研究现状林晓燕¹ 张叔人¹ 徐恒^{2*}

1. 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021;

2. Emory University School of Medicine, GA 30332, USA

摘要 DNA 聚合酶 δ (DNA polymerase δ) 是真核生物 DNA 复制的主要复制酶, 同时还参与 DNA 修复, 对保持真核生物基因组的结构完整性和遗传稳定性具有重要作用. 对 DNA 聚合酶 δ 蛋白功能活性及其基因表达机制的研究因受技术上的限制而未能深入研究. 由于其重要的生物学功能, 目前引起人们的更多关注和重视. 文中就该酶的生物学功能、亚基组成、核心酶的分子表达调控以及与其他蛋白相互作用等方面对国内外 DNA 聚合酶 δ 的研究进行简要综述.

关键词**1 真核生物 DNA 聚合酶 δ 的发现和早期的研究**

DNA 聚合酶 δ 作为一个新的哺乳动物细胞 DNA 聚合酶是于 1976 年从增生的骨髓红细胞中纯化鉴定的^[1]. 它也同样能从快速生长的牛胸腺细胞中提取^[2]. 与其他真核生物 DNA 聚合酶如 DNA 聚合酶 α (DNA polymerase α) 相比, 该酶具有一个内在的 3'-5' 核酸外切酶活性^[1,2]. 这种核酸外切酶活性与原核生物中那些具有 3'-5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶的复制校正功能相同^[3]. 等电聚焦电泳、DEAE-Sephadex 层析色谱和原位分析表明 DNA 聚合酶 δ 所拥有的 DNA 聚合酶和核酸外切酶两种活性共存于同一个蛋白质中, 并表现协调一致的关系^[1,2,4].

由于 DNA 聚合酶 α 在真核细胞中的含量居 DNA 聚合酶之首, 人们曾认为它是真核细胞惟一真正的 DNA 复制酶. 因此, 在早期的研究中 DNA 聚合酶 δ 是被作为 DNA 聚合酶 α 的功能结合体, 一个

具有 3'-5' 校正的 DNA 聚合酶所认识的^[2,5]. 后来的研究发现只有 1 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度的 DNA 复制抑制物 BuPdGTP, 就能阻断 DNA 聚合酶 α 的复制活性, 而 DNA 聚合酶 δ 复制活性的抑制需高达 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 BuPdGTP^[6]. 抗 DNA 聚合酶 α 抗体在一个含有 DNA 聚合酶 α 和 δ 的 DNA 复制体系中的免疫竞争能抑制 DNA 聚合酶 α 的复制活性而并不影响 DNA 聚合酶 δ 的高复制活性^[7]. 这些实验表明 DNA 聚合酶 δ 也是一个具有 DNA 复制功能的 DNA 聚合酶, 然而当时不清楚它是以一种什么样的复制模式进行 DNA 复制.

直到十多年后 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 作为 DNA 聚合酶 δ 的进行性辅助蛋白被分离鉴定, 人们才认识到 DNA 聚合酶 δ 可能是借助辅助蛋白形成的移动平台进行 DNA 复制, 并且是真核细胞中最主要的 DNA 复制酶^[8]. PCNA 可以提高 DNA 聚合酶 δ 的活性, 而并不影响 DNA 聚合酶 α 的活性, 这在一定程度上证明这两种酶以不同方式参与 DNA 复制^[8].

2004-05-25 收稿, 2004-07-06 收修改稿

* 通讯作者, E-mail: hunterhsu688@sina.com

2 真核生物 DNA 聚合酶 δ 的生物学功能

近年来,随着真核细胞 DNA 复制体外模型的建立和 DNA 聚合酶基因的克隆,目前已经在人体细胞中发现了 14 种不同的 DNA 模板依赖型 DNA 聚合酶(DNA template-dependent DNA polymerases)和一个与 DNA 模板无关的 DNA 聚合酶——末端转移酶^[9]。根据它们的氨基酸序列同源性和蛋白结构相似性,这些 DNA 聚合酶分别归属于 4 个不同分类: A, B, X 和 Y^[9]。与大肠杆菌 RB69 复制酶一样,真核细胞 DNA 聚合酶 δ 和 α 及 ϵ 属于 B 类^[9]。由于纯化与分离技术上的困难和限制,至今没有得到人 DNA 聚合酶 δ 的蛋白晶体。因此对其生物学功能的研究主要是借助 RB69 复制酶蛋白的三维结构来解释。

2.1 DNA 聚合酶 δ 的 DNA 复制功能

猴肾病毒 40(SV40)基因组的复制机制与细胞染色体的复制有些相似,因此它是一个非常好的 DNA 复制模型。真核生物 DNA 聚合酶 δ 的 DNA 复制功能就是利用这个复制系统确定的^[10]。只有在这个系统中加入相当高浓度的 PCNA 时,SV40 DNA 复制的延伸阶段才能被 DNA 聚合酶 δ 完成。这说明 PCNA 分子可能形成一个聚合体作为移动平台促使 DNA 聚合酶 δ 沿着 DNA 模板前进而复制 DNA^[10]。

一系列酵母遗传学实验进一步鉴定了参与 DNA 复制的相关蛋白,并证实了复制的基本机制^[11]。目前普遍认为 DNA 聚合酶 δ 在复制叉中不仅合成前导链,也参与后随链的合成。当 DNA 复制起始后, DNA 聚合酶 α 其所含有的引物酶活性首先合成 RNA 引物,然后其内在的 5'-3' DNA 聚合酶活性在 RNA 引物 3' 末端合成 DNA 而形成 RNA/DNA 杂交分子(通常 10 个 RNA 核苷酸接着 20-30 个 DNA 核苷酸)^[11]。接着 RFC(replication factor C)识别这些引物杂交分子并结合在末端;PCNA 与 RFC 相互作用于此。与此同时,一个被 RFC 催化的 ATP 代谢反应过程促进了 DNA 聚合酶转换(DNA polymerase switch)的发生^[12]。这个转换机制使没有持续合成 DNA 能力的 DNA 聚合酶 α 离开模板,而 DNA 聚合酶 δ 则与 PCNA-RFC 结合形成一个全酶(holoen-

zyme)从引物 3' 末端开始沿着模板以 5'-3' 的方向持续合成前导链 DNA^[12]。后随链 DNA 复制则是通过 DNA 聚合酶 α 启动并由 DNA 聚合酶 δ -PCNA-RFC 复制全酶沿着模板以 5'-3' 的方向持续合成不连续的冈崎片段(Okazaki fragments)完成的^[11]。最后,一组与复制有关的蛋白质包括 DNA 聚合酶 δ 连接冈崎片段形成一完整的 DNA 链^[11]。

2.2 DNA 聚合酶 δ 的 3'-5' 核酸外切酶功能

真核生物 DNA 复制的高度忠实性主要来自 DNA 聚合酶 δ 的 3'-5' 校正能力(proof-reading)。DNA 聚合酶 δ 的 3'-5' 核酸外切酶活性区域位于 DNA 聚合酶 δ 蛋白的 N-末端。对酵母 DNA 聚合酶 δ 基因中高度保守的序列进行突变实验发现其 3'-5' 核酸外切酶活性主要位于 3 个小的精确的区域 ExoI (310-326), ExoII (393-409) 和 ExoIII (504-519)^[13]。将真核生物 DNA 聚合酶 δ 核酸外切区域与大肠杆菌 RB69 复制酶进行同源比较分析发现, DNA 聚合酶 δ 的核酸外切区域(310-519)与 RB69 复制酶外切酶区域(108-390)具有 22% 的同源性和 41% 的相似性。

RB69 复制酶蛋白三维结构分析表明 B 类 DNA 聚合酶中最保守的氨基酸形成 4 个明显的表现其催化活性的空间结构区(palm, fingers, thumb 和 exo)。聚合酶催化位点处于 fingers 和 palm 之间。单链模板结合到 fingers 部位,被 DNA 聚合酶 δ 的 5'-3' 聚合酶催化复制合成。核酸外切酶活性结构区(exo)与聚合酶催化位点间隔相距 3 nm^[14,15]。当一个不正确的碱基被插入到复制合成链的 3' 末端,会引起 DNA 二聚体末端的解链。这时 DNA 聚合酶 δ 的 5'-3' 聚合酶催化功能就会停止,复制链 3' 末端被转移到核酸外切酶活性结构区域(exo)。错误配对到复制合成链 3' 末端的碱基就在这个结构区域以 3'-5' 的方向被校正切除。然后,这个被校正的 3' 末端再移回聚合酶催化结构区域,聚合酶催化功能重新从这个正确的拷贝上以 5'-3' 的方向进行复制合成^[14,15]。这样, DNA 聚合酶 δ 本身的聚合酶催化和核酸外切酶校正两种功能的来回穿梭保证了 DNA 复制的高度忠实性,使 DNA 复制的误差率只有 10^{-9} ^[14,15]。

2.3 DNA聚合酶 δ 的生物学功能

现在仍然不是十分清楚是否有其他蛋白质参与而使DNA聚合酶 δ 能够在复制中完成聚合酶转换机制和行使其本身的两种酶活性功能的穿梭机制。除了在DNA复制中保持DNA复制的高度忠实性这一主要作用外,越来越多的证据表明具有5'-3'聚合酶催化和3'-5'核酸外切酶校正两种功能的DNA聚合酶 δ 与其他复制、修复或调控蛋白相互作用在DNA修复、DNA重组、细胞周期调控及DNA损伤检测中也起着重要作用^[16](见下文讨论)。比如,DNA聚合酶 δ 与PCNA和其他修复蛋白相互作用在碱基切除修复(BER)中作为一个back-up酶参与DNA修复^[17]。

3 真核生物(人类)DNA聚合酶 δ 的亚基组成

真核生物DNA聚合酶 δ 是最保守的DNA聚合酶,长期以来一直认为DNA聚合酶 δ 只由p125和p50两个亚基组成。但随着蛋白质分离技术的发展,现在已鉴定哺乳动物细胞DNA聚合酶 δ 有4个亚基(p125, p66, p50和p12),粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)有5个亚基(p125, p55, p54, p40和p12)以及啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)有3个亚基(p125, p58和p55)^[18]。

p125是DNA聚合酶 δ 的催化亚基,具有5'-3' DNA聚合酶和3'-5'核酸外切酶功能。编码p125的基因称为POLDI。现已从人、牛、小鼠、小鼠、果蝇(*Drosophila*)、啤酒酵母、粟酒裂殖酵母、假丝酵母(*Candida*)、以及疟原虫(*plasmodium falciparum*)中分离到编码p125的cDNA。DNA聚合酶 δ 是B类DNA聚合酶中最保守的,人和鼠之间p125序列同源性高达93%,人和酵母之间同源性为50%—60%^[5]。与DNA聚合酶 α 和 ϵ 相似,p125也含有6个保守的聚合酶同源序列区,IV区在N-末端,接着顺序是II,VI,III,I和V区^[19]。同源区I具有较高的保守性,而IV的保守性最低^[19]。同源区I含有形成所有B类DNA聚合酶催化活性位点的保守序列(YGDTDS),通过结合金属离子激活酶的活性。同源区II中的保守序列(DxxSLYPS)和同源区III中的某些氨基酸对脱氧核苷三磷酸

(dNTP)的结合也是重要的。对这些保守的氨基酸进行缺失突变可以改变对不同dNTP的敏感性。同源区IV是3'-5'核酸外切酶活性位点的一部分。同源区V和VI与p125的蛋白三维结构有关^[19]。对高度保守的酵母DNA聚合酶 δ 缺失突变确定了3个位于N-末端的3'-5'核酸外切酶功能区域,ExoI,ExoII和ExoIII(氨基酸310-519)。ExoI功能区在聚合酶同源区IV之前,ExoII紧随着IV并有一部分与其重叠,ExoIII位于同源区IV和II之间^[13]。聚合酶同源区和外切酶功能区的这种结构配置体现了DNA聚合酶 δ 的两种活性功能。另外,在酵母和哺乳动物p125的N末端还鉴定了其他一些高度保守的区域,N1-N5。这些区域可能是DNA聚合酶 δ 与其他蛋白相互作用的位点^[20],如DNA聚合酶 δ 与PCNA相互结合于N2区域^[21]。p125的C-末端(氨基酸850-1105)是相当保守的,从酵母到人其同源性可达89%。除了高度保守的区域CT-1,CT-2和CT-3外,p125的C-末端还有两个富含高度保守的半胱氨酸的锌指状结构:ZnF1和ZnF2^[5,21]。CT-1,CT-2和CT-3与疱疹病毒的DNA聚合酶具有同源性。ZnF1和ZnF2两个指状结构域只存在于真核细胞B类DNA聚合酶中,目前认为它们参与蛋白-DNA和蛋白-蛋白的相互作用^[5]。以上所述保守区域对DNA聚合酶 δ 行使功能是十分重要的。体外试验证明对这些区域的缺失变异常能直接导致人类DNA聚合酶 δ 活性的降低或完全丧失^[23]。目前已在结肠癌和乳腺癌细胞中检测到了一些影响p125蛋白结构和活性的基因变异^[24]。应用含有D400A/D400A纯合子的老鼠表明ExoII功能区中D400A的点突变所造成的校正缺陷能高度致癌^[25]。

p50蛋白是DNA聚合酶 δ 的小亚基。从人、牛和鼠中分离到编码p50的基因POLD2^[22]。在哺乳动物中p50的保守性和p125的保守性相似,但在酵母中p125的保守性却高于p50^[26]。氨基酸序列分析表明不同哺乳动物中POLD2具有较高的保守性。人和老鼠之间p50的同源性和相似性分别为94%和97%,而酵母p50与人的同源性和相似性分别只有34%和35%^[26]。酵母双杂交分析表明p50和p125相互作用,意味着p50可能对激活DNA聚合酶 δ 结合到PCNA上是必需的^[26]。目前对p50的研究很有限,因此对其精确的功能还不是很清楚。

真核生物 DNA 聚合酶 δ 的第三个亚基在哺乳动物、粟酒裂殖酵母和啤酒酵母分别称为 p66, Cdc27 和 Pol32p^[27-29]。免疫亲和层析显示牛胸腺 DNA 聚合酶 δ 的第三个亚基是未知基因 KIAA0039 的产物^[30]。BLAST 序列分析显示 p66, Cdc27 和 Pol32p 三者仅有 15%—20% 的同源性, 表明三者之间在进化方面的保守性很低^[29]。它们的 C-末端有一小段明显保守的同源序列, 这是 PCNA 的结合位点^[27-30]。利用 PCNA 亲和柱层析从老鼠细胞中分离和鉴定了 p66; 发现除了与 PCNA 结合外, 它可能也与 RFC 结合。因此, p66 对执行一个完整的 DNA 聚合酶 δ 活性是必需的^[27]。在粟酒裂殖酵母中 Cdc27 与另一个 DNA 聚合酶 δ 的小亚基 (Cdc1) 结合, 是完成细胞周期 G2/M 转换所必需的^[28,31]。同样, 啤酒酵母中的 Pol32p 也在细胞周期 G2/M 转换中起作用^[32]。利用酵母双杂交实验证明 Pol32p 可以与 DNA 聚合酶 α 催化亚基相互作用, 这可能是后随链上聚合酶转换的一种机制^[32]。

利用传统的方法在哺乳动物细胞中只能分离到以 p125 和 p50 组成的核心酶。为了在哺乳动物细胞中分离出 DNA 聚合酶 δ 的其他亚基, Liu 等采用一种新的分离纯化策略, 得到活性提高到 10000 单位/mg、与 PCNA 的结合能力提高了 20—40 倍的 (包括 p125, p66 和 p50) 复合物^[33]。将这种纯化的蛋白复合物进行质谱 (LC/MS/MS) 分析, 得到一个分子质量大小为 12 ku 的蛋白序列。在人类 EST 数据库中进行 tBlastn 检索找到一个与这个蛋白序列相匹配的未知基因 AA40211。同时用粟酒裂殖酵母 DNA 聚合酶 δ 的第四亚基 Cdm1 蛋白序列在 NCBI 中进行 tBlastn 检索也查到 AA402118^[33]。将这个 EST cDNA 克隆进行测序分析得到一个编码 107 个氨基酸的开放阅读框 (ORF), 分子质量约为 12.4 ku, 这个蛋白质被命名为 p12, 在 GenBank 中的登录号为 AT179890。蛋白同源分析表明 p12 与 Cdm1 (160 个氨基酸) 有 25% 的同源性和 39% 的相似性。免疫分析进一步证实 p12 是哺乳动物 DNA 聚合酶 δ 的一个组成成分^[33]。到目前为止, 还没有任何关于 p12 功能的报道。

4 真核生物(人类)DNA 聚合酶 δ 的分子表达调控

DNA 聚合酶 δ 是真核细胞中主要的 DNA 复制

酶, 其聚合酶和外切酶活性主要集中在催化亚基 p125 上, 而 p50 是 p125 发挥活性所必需的亚基。因此探讨它们的分子表达调控对研究真核生物 DNA 复制和修复具有重要意义。

原位杂交表明编码人的 p125 的基因 *POLD1* 位于染色体 19q13.3—13.4, 而小鼠 *POLD1* 则位于第 7 号染色体^[34]。人的 p125 的 cDNA 长度约 3.4 kb; 其相对应的基因 DNA 序列长约 32 kb。测序分析表明人的 p125 由 1107 个氨基酸组成, 与牛的有 94% 同源^[35]。*POLD1* 基因由 27 个外显子和 26 个内含子组成。外显子和大部分内含子相对比较小, 外显子的大小约为 55—201 bp, 其中 7 个内含子小于 100 bp, 只有内含子 I 比较大, 约为 10 kb。所有外显子和内含子之间的连接序列与已报道的共有序列 (consensus sequences) 相似。在某些内含子中发现多个 Alu 重复序列和不规则数目的串连重复序列^[36]。同许多哺乳动物的“看家 (housekeeping)”基因的启动子一样, 其 5'-端启动子上游区域富含 G/C, 不含有 TATA box。该基因可能有多个转录起始点, 但主要起始位点在起始密码子 ATG 上游 53 个核苷酸处^[36]。

在 *POLD1* 启动子位于 -92—-22 之间的区域有两个正向重复的 11 bp 的序列 (5'-GGGCGTGGCC-3'), 缺失其中任一个或两个序列都缺失可导致 *POLD1* 启动子活性降低 2—4 倍或完全丧失。其左侧序列 5'-GGGCGT-3' 同 Sp1 的结合序列 5'-GGGCGG-3' 具有同源性。DNA 印迹分析 (South-western blot) 和利用 Sp1 抗体检测的凝胶电泳移动实验 (electrophoretic mobility shift assay) 证明 Sp1 和与其相互作用的蛋白形成复合体结合在这个重复序列上。用这个 11 bp 的 DNA 片段作探针从 HeLa 细胞 cDNA 文库中筛选出 Sp1 家族中的另一个结合在 11 bp 重复序列的结合蛋白 Sp3^[37]。此外, 在 *POLD1* 启动子位于 -68—-58 的区域还存在一个称为 E-box 的负调控序列, 其所含的核苷酸序列 5'-CACTTG-3' 与螺旋-环-螺旋蛋白 (helix-loop-helix) 和螺旋-环-螺旋-拉链 (helix-loop-helix-zipper) 蛋白的结合位点相似^[37]。进一步的研究发现, p53 能抑制 Sp1 刺激的 *POLD1* 启动子活性。这可能是由于在 Sp1 的结合位点部分重叠了一个 p53 的结合位点, p53 对 *POLD1* 启动子的结合竞争性地抑制了

Sp1的结合,而导致Sp1的调节作用降低^[38].在快速生长的人急性淋巴白血病 Molt4 细胞中 p125mRNA 和蛋白质水平在 G1/S 期间达到高峰,而且其基因 *POLD1* 的启动子活性诱导在此时也增加了4倍,这意味着 *POLD1* 基因表达在转录水平受细胞周期的调控^[39].但是至今不清楚这种调控机制,也不知道有哪些调控因子参与这种细胞周期依赖的 *POLD1* 基因表达调控.应用不同长度的 *POLD1* 启动子与荧光酶报告基因的重组表达质粒转染乳腺癌细胞系 MCF-7 和正常乳腺细胞系 MCF-10A,发现 *POLD1* 启动子的激活在两种细胞中是不同的.相对正常细胞,在肿瘤细胞中 *POLD1* 启动子的-214--324区域含有上调表达因子的结合序列;-325--635区域含有下调表达因子的结合序列^[40].用不同 *POLD1* 启动子区域作为核蛋白结合的底物,凝胶电泳移动实验(EMSA)清楚显示癌细胞和正常细胞两者有不同的移动滞留带,即不同的DNA核蛋白复合物¹⁾.这些实验表明在癌细胞中可能存在某些不同于正常细胞或不同于正常细胞水平的 *POLD1* 启动子的结合蛋白,它们可能与恶性增殖的癌细胞中 *POLD1* 基因异常表达的调控相关.然而,进一步的研究需要分离和鉴定这些结合蛋白以及它们所参与的调控作用.

编码人类 p50 的基因 *POLD2* 位于第7号染色体,然而小鼠 *POLD2* 则位于第11号染色体 A2 区域中^[22,26].通过引物延伸和从 HeLa 细胞中提纯的 p50 mRNA 5'-RACE 的分析研究表明 *POLD2* 的转录起始位点位于翻译起点上游第93个核苷酸处,刚好位于第一个外显子和内含子交界上游第37个核苷酸位点,因此第一个内含子位于翻译起始位点上游第56位核苷酸处^[40].通过限制性内切酶重组、Southern 杂交、PCR 和 DNA 测序分析表明 *POLD2* 的长度约为10 kb,由11个外显子和10个内含子相互间隔组成,外显子和内含子之间的剪切连接序列符合 5'-AG/GT-3' 原则^[41].第一个外显子的大小为37 bp,是5'mRNA的UTR序列,外显子2-11是 *POLD2* 的编码信息.内含子1和2是所有的内含子中最长的,大小分别为1.4 kb 和

3.7 kb. *POLD2* 5'-端上游序列富含 G+C,但不含有典型的 TATA box.利用 TRANSFAC 程序 (<http://transfac.gbf.de/>) 分析 *POLD2* 5'-端上游序列发现其含有一些潜在的转录因子的结合位点,如 Sp1, Ap1, Ap2, NF-1, CREB 和 NF-Y 等^[40].但至今没有进一步研究了解这些转录因子或其他调控因子对 *POLD2* 表达的调节功能.在 *POLD1* 和 *POLD2* 两者 5'-端上游序列上都存在 Sp1 的结合位点,说明 Sp1 可能共同调控 DNA 聚合酶 δ 的大小亚基的转录.

到目前为止,还没有任何文献报道有关人类 DNA 聚合酶 δ 其他两个亚基(p66 和 p12)的基因表达调控.

5 人 DNA 聚合酶 δ 主导的 DNA 复制及其调控中的蛋白相互作用

真核生物染色体 DNA 复制是一个高度复杂并且受到严密调控的过程,依赖多种蛋白因子和酶的相互作用完成.从 HeLa 细胞中部分纯化的 DNA 复制多蛋白复合物在体外可以启动 SV40 DNA 的复制,这个复合物包括 DNA 聚合酶 δ , DNA 聚合酶 α /引发酶,拓扑异构酶 I 和 II, RFC, RPA, RNase H, DNA 依赖 ATP 酶, DNA 连接酶, DNA 解旋酶以及 PCNA 等^[42,43].用蛋白质印迹分析 PCNA-亲和吸附方法纯化的蛋白复合物,发现与 PCNA 相互作用的蛋白不仅包括 DNA 聚合酶 δ 在内的一些复制蛋白还包含一些细胞周期蛋白,比如 Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, p21 等等^[44].由于 PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的行进性辅助蛋白,所以这些发现表明 DNA 聚合酶 δ 可能通过 PCNA 与其他蛋白相互作用组成 DNA 复制多蛋白复合物来完成 DNA 复制,并通过 PCNA 与细胞周期调控相连而接受后者的严密控制.

PCNA 首先作为 DNA 聚合酶 δ 的激活因子而被人们认识,是 DNA 聚合酶 δ 行使复制功能的最关键行进性辅助蛋白^[8,45].PCNA 带正电荷,含有丰富的亲水区和疏水区,在细胞核中,3个 PCNA 形成一个环状三联体有效地握住带负电荷的 DNA,然

1) Hsu H, Zhang P, Lee M Y W T. Expression profiling of DNA polymerase δ catalytic subunit gene (*POLD1*) in breast cancer. Unpublished data

后 DNA 聚合酶 δ 直接与它结合才能启动正常的 DNA 复制^[46,47]。小牛胸腺 DNA 聚合酶 δ 大亚基 (p125) N-末端的缺失研究发现 p125 的 N-末端可能通过与 PCNA 或其他蛋白因子如 RFC, RPA 等相互作用, 在复制叉处稳定 DNA 聚合酶 δ 全酶^[48]。近年的研究发现在哺乳动物和人的细胞中 PCNA 至少能与 30 个以上的蛋白质相互作用^[49]。一系列的实验证明这些蛋白质是通过它们本身所含有的一个保守特征序列——Qxx(I/L/M)xx(F/H)(F/Y)与 PCNA 相互作用的^[49]。在 p125 中, 这个特征序列位于 N2 区域^[48]。越来越多的证据表明 PCNA 是不同 DNA 修复系统的主要成分, 是完成不同 DNA 修复的必须成分(包括碱基切除修复、核苷酸切除修复及错配修复)^[49], 因此 DNA 聚合酶 δ 和 PCNA 直接参与完成的 DNA 复制和 DNA 修复是细胞繁殖和自身稳定的两个主要功能, 它们相辅相成地完成精确的 DNA 复制和细胞增殖。

尽管已认识到 DNA 聚合酶 δ 是惟一与细胞周期有关、在染色体 DNA 复制中起着主导作用的 DNA 复制酶, 但对其本身亚基, DNA 复制多蛋白复合体和通过 PCNA 与其他蛋白结合这 3 个层次上的蛋白相互作用的确切机制仍然不是很清楚。比如, 人 DNA 聚合酶 δ 的 4 个亚基彼此之间如何相互作用? 人 DNA 聚合酶 δ 是如何通过其 4 个亚基与 DNA 复制多蛋白复合体中其他蛋白相互作用? 通过 PCNA 与其他蛋白结合, 人 DNA 聚合酶 δ 是如何受到细胞周期调控去执行 DNA 复制或去完成 DNA 修复? 因此进一步研究这些蛋白质的相互作用将有助于我们更好地了解真核生物 DNA 聚合酶 δ 亚基的组装和 DNA 复制多蛋白复合体的组合; 对复制体中每一个成分的结构研究可以使我们进一步了解复制体中具有调节作用的众多蛋白间的相互作用及其表现出来的所完成的相应的细胞功能。

参 考 文 献

- Byrnes J J, Downey K M, Black V L, et al. A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta. *Biochemistry*, 1976, 15: 2817—2823
- Lee M Y, Tan C K, So A G, et al. Purification of deoxyribonucleic acid polymerase delta from calf thymus: Partial characterization of physical properties. *Biochemistry*, 1980, 19: 2096—2101
- Lee M Y, Whyte W A. Selective affinity chromatography of DNA polymerases with associated 3' to 5' exonuclease activities. *Anal Biochem*, 1984, 138: 291—297
- Goscin L P, Byrnes J J. DNA polymerase delta: One polypeptide, two activities. *Biochemistry*, 1982, 21: 2513—2518
- Hindges R, Hubscher U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol Chem*, 1997, 378: 345—362
- Byrnes J J. Differential inhibitors of DNA polymerases alpha and delta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 132: 628—634
- Hammond R A, Byrnes J J, Miller M R. Identification of DNA polymerase delta in CV-1 cells: Studies implicating both DNA polymerase delta and DNA polymerase alpha in DNA replication. *Biochemistry*, 1987, 26: 6817—6824
- Bravo R, Frank R, Blundell P A, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature*, 1987, 326: 515—517
- Polina V S, Katarzyna B, Thomas A K. Functions of eukaryotic DNA polymerase. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2003, 8: 1—11
- Prelich G, Tan C K, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature*, 1987, 326: 517—520
- Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 721—751
- Maga G, Stucki M, Spaadari S, et al. DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol*, 2000, 295: 791—801
- Yang C L, Chang L S, Zhang P, et al. Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 735—745
- Joyce C M, Steitz T A. Polymerase structures and function: Variations on a theme? *J Bacteriol*, 1995, 177: 6321—6329
- Baker T A, Bell S P. Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell*, 1992, 92: 295—305
- Shevelev I V, Hubscher U. The 3'-5' exonuclease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 364—376
- Stucki M, Pascucci B, Parlanti E, et al. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, 1998, 17: 835—843
- Burgers P M, Gerik K J. Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J Biol Chem*, 1998, 273: 19756—19762
- Brautigam C A, Steitz T A. Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8: 54—63
- Hao H, Jiang Y, Zhang S J, et al. Structural and functional relationships of human DNA polymerases. *Chromosoma*, 1998, 102: S121—S127
- Zhang S J, Zeng X R, Zhang P, et al. A conserved region in the

- amino terminus* of DNA polymerase delta is involved in proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem*, 1995, 270: 7988—7992
- 22 Zhang J, Tan C K, McMullen B, et al. Cloning of the cDNAs for the small subunits of bovine and human DNA polymerase delta and chromosomal location of the human gene (POLD2). *Genomics*, 1995, 29: 179—186
 - 23 Wu S M, Zhang P, Zeng X R, et al. Characterization of the p125 subunit of human DNA polymerase delta and its deletion mutants. Interaction with cyclin-dependent kinase-cyclins. *J Biol Chem*, 1998, 273: 9561—9569
 - 24 Flohr T, Dai J C, Buttner J, et al. Detection of mutations in the DNA polymerase delta gene of human sporadic colorectal cancers and colon cancer cell lines. *Int J Cancer*, 1999, 80: 919—929
 - 25 Goldsby R E, Hays L E, Chen X, et al. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15560—15565
 - 26 Hindges R, Hubscher U. Cloning, chromosomal localization, and interspecies interaction of mouse DNA polymerase delta small subunit (PolD2). *Genomics*, 1997, 44: 45—51
 - 27 Hughes P, Tratner I, Ducoux M, et al. Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase delta by PCNA-affinity chromatography of mouse FM3A cell extracts. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 2108—2114
 - 28 Hughes D A, MacNeill S A, Fantes P A. Molecular cloning and sequence analysis of *cdc27+* required for the G2-M transition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, 1992, 231: 401—410
 - 29 Gerik K J, Li X, Pautz A, et al. Characterization of the two small subunits of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J Biol Chem*, 1998, 273: 19747—19755
 - 30 Mo J, Liu L, Leon A, et al. Evidence that DNA polymerase delta isolated by immunoadfinity chromatography exhibits high-molecular weight characteristics and is associated with the KIAA0039 protein and RPA. *Biochemistry*, 2000, 39: 7245—7254
 - 31 MacNeill S A, Moreno S, Reynolds N, et al. The fission yeast Cdc1 protein, a homologue of the small subunit of DNA polymerase delta, binds to Pol3 and Cdc27. *EMBO J*, 1996, 15: 4613—4628
 - 32 Huang M E, Le Douarin B, Henry C, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* protein YJR043C (Pol32) interacts with the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Gen Genet*, 1999, 260: 541—550
 - 33 Liu L, Mo J, Rodriguez-Belmonte E M, et al. Identification of a fourth subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem*, 2000, 275: 18739—18744
 - 34 Kemper R R, Ahn E R, Zhang P, et al. Human DNA polymerase delta gene maps to region 19q13. 3-q13. 4 by *in situ* hybridization. *Genomics*, 1992, 14: 205—206
 - 35 Chung D W, Zhang J A, Tan C K, et al. Primary structure of the catalytic subunit of human DNA polymerase delta and chromosomal location of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11197—11201
 - 36 Chang L S, Zhao L, Zhu L, et al. Structure of the gene for the catalytic subunit of human DNA polymerase delta (POLD1). *Genomics*, 1995, 28: 411—419
 - 37 Zhao L, Chang L S. The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 1997, 272: 4869—4882
 - 38 Li B, Lee M Y. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem*, 2001, 276: 29729—29739
 - 39 Zeng X R, Hao H, Jiang Y, et al. Regulation of human DNA polymerase delta during the cell cycle. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24027—24033
 - 40 Perez A, Leon A, Lee M Y. Characterization of the 5'-flanking region of the gene encoding the 50 kDa subunit of human DNA polymerase delta. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493: 231—236
 - 41 Mount S M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10: 459—472
 - 42 Malkas L H, Hickey R J, Li C, et al. A 21S enzyme complex from HeLa cells that functions in simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Biochemistry*, 1990, 29: 6362—6374
 - 43 Applegren N, Hickey R J, Kleinschmidt A M, et al. Further characterization of the human cell multiprotein DNA replication complex. *J Cell Biochem*, 1995, 59: 91—107
 - 44 Loor G, Zhang S J, Zhang P, et al. Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 5041—5046
 - 45 Tan C K, Castillo C, So A G, et al. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem*, 1986, 261: 12310—12316
 - 46 Krishna T S, Kong X P, Gary S, et al. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 1994, 79: 1233—1243
 - 47 Moarefi I, Jeruzalmi D, Turner J, et al. Crystal structure of the DNA polymerase processivity factor of T4 bacteriophage. *J Mol Biol*, 2000, 296: 1215—1223
 - 48 Zhang P, Mo J Y, Perez A, et al. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J Biol Chem*, 1999, 274: 26647—26653
 - 49 Warbrick E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays*, 2000, 22: 997—1006