



基因组磷硫酰化修饰的研究进展及展望

高雅丽, 邓子新, 陈实*

武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072

摘要: DNA磷硫酰化修饰是DNA骨架上的第一例生理修饰。该修饰由*dndABCDE*编码的5个蛋白协同作用, 以硫原子取代DNA磷酸二酯键上一个非桥接的氧原子。研究发现, DNA磷硫酰化修饰广泛存在于各种微生物中, 在不同细菌中存在序列特异性, 且具有 R_p 空间构象专一性。近年来, 对DNA磷硫酰化修饰的研究取得了一系列的成果。为了对DNA磷硫酰化修饰有一个系统全面的了解, 本文将就这一特殊生理修饰的发现过程, 研究进展, 未来所面临的机遇及挑战作一个简要的概述。

关键词: 磷硫酰化修饰, DNA骨架修饰

DNA由碳、氢、氧、氮、磷5种元素组成, 是生命的遗传物质, 组成了遗传指令, 引导生物发育与生命机能运作^[1-2]。1953年, 詹姆斯·沃森与弗朗西斯·克里克, 提出了最早的DNA结构精确模型——DNA双螺旋结构^[2], 标志着分子生物学的诞生。DNA结构上发生一些化学修饰所产生的细微变化, 都可能对生物体的生命活动产生重要的影响。DNA的甲基化修饰是最早发现的修饰方式之一^[3-4], 是表观遗传学的重要组成部分, 不仅参与DNA半保留复制的错配修复, 基因的表达调控, 细胞正常功能的维持, 还在遗传、发育以及肿瘤等疾病的发生中起着重要作用^[5]。因此, 关于DNA结构修饰的研究一直是生物科学研究的热点。然而, 在甲基化修饰发现后的近50年来, 人们并未在DNA的结构上发现其它任何形式的生理性修

饰, 直到DNA磷硫酰化修饰的出现^[6]。天然存在的DNA骨架上磷硫酰化修饰结构的发现, 改变了以往普遍认为的DNA由5种元素构成的看法, 将人们的目光吸引到了第六元素——硫元素上, 是既DNA甲基化修饰之后, 对DNA修饰结构的又一重要补充^[7]。随着研究的不断深入, DNA磷硫酰化修饰这一领域的研究取得了系统性的进展。为了对这一新兴领域有更加系统全面的了解, 本文将就DNA磷硫酰化修饰相关的研究成果及进展作一个系统的概述。

1 DNA磷硫酰化修饰的发现

1.1 DNA降解(Dnd)现象

周秀芬等在体外操作DNA的时候发现, 变铅

基金项目: 国家自然科学基金(31520103902, 31170070, 31222001, 31170049)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-68756643; E-mail: shichen@whu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-02; 修回日期: 2016-05-17; 网络出版日期: 2016-06-06

青链霉菌1326的DNA在普通的琼脂糖凝胶电泳过程中发生了Dnd (DNA degradation)现象, 而天蓝色链霉菌的DNA却呈现出清晰的条带^[6]。此外, 沙门菌属菌株*Salmonella enterica* serovar Cerro isolate 87、荧光假单胞菌*Pseudomonas fluorescens* PfO-1等许多不同种属微生物的DNA在电泳过程中也存在这种降解现象^[6,8-12]。Dyson等提出, 这种DNA降解现象是由电泳过程中阳极积累所产生的Tris过酸衍生物介导的氧化切割反应造成的, 可以被硫脲有效抑制^[13-15]。这一现象表明, 产生DNA降解现象的变铅青链霉菌1326中可能存在一种不同于甲基化修饰的新型修饰系统。

1.2 DNA磷硫酰化修饰为复制后修饰

根据发生的时间, DNA的修饰分为复制前修饰和复制后修饰。复制前修饰发生在单核苷酸水平上, 发生修饰后的单核苷酸在复制过程中通过DNA聚合酶的作用掺入到新生链中^[16]; 复制后修饰发生在多聚核苷酸水平上, 修饰酶在多聚核苷酸水平上对正常碱基进行修饰。复制后修饰过程中, 修饰酶对DNA的序列特异性有一定要求, 修饰往往发生在特定的序列上^[17]。

Dyson等^[18]对DNA上Dnd修饰的机制进行研究后, 提出Dnd修饰为复制后修饰。一方面是因为Dnd修饰的发生需要保守的中心序列、一定长度的侧翼序列和可能的二级结构。另一方面, 质粒复制中间体的单链不能被Tris过酸衍生物切割, 暗示质粒复制中间体上可能不存在修饰位点, 因为被修饰的双链DNA在变性成单链DNA后仍然能被切割。

1.3 *dnd*修饰基因簇的鉴定

利用互补实验, 周秀芬等^[6,19-21]发现一个柯斯质粒上携带了修饰相关的功能区域, 能够重新赋予突变株ZX1 DNA降解表型。李爱英等^[22]将能够重新赋予突变株ZX1 DNA降解表型的相关基因簇定位到了8024 bp的DNA片段上。对这8024 bp的

DNA进行测序分析, 定位了包括*dndA-E* 5个基因的*dnd*基因簇^[6]。*dnd*基因簇由2个反向的操纵子组成, 其中*dndBCDE*转录方向相同, 共同构成一个操纵子, 而*dndA*的转录方向则与*dndBCDE*相反^[6]。基因置换实验表明, *dndA*, *dndC*, *dndD*, *dndE*是这种异常修饰的必需基因, 而*dndB*并非是异常修饰的必需基因, 可能参与这种特殊修饰的调节^[6,23]。

1.4 磷硫酰化修饰的化学本质

对*dnd*基因簇所编码的Dnd蛋白功能进行分析, 发现DndA、DndC与硫代谢有着密切的联系, 提示Dnd异常修饰可能与硫相关。周秀芬等^[6]用Na₂³⁵SO₄对一系列野生型菌株及突变株进行放射性硫喂养, 之后对其DNA上的放射性硫信号进行检测。结果显示, 在具有Dnd表型菌株的DNA上均能检测到放射性硫信号, 而在不含Dnd表型的突变株中却检测不到。硫喂养实验提示DNA上存在硫元素。

王连荣等^[24-25]用[35^S]-L-半胱氨酸喂养实验将大肠杆菌B7A, DH10B(pJTU1238)及阴性对照DH10B(SK+)的DNA进行了放射性硫标记, 之后进行基因组DNA的提取、酶解^[26]。通过高压液相-质谱分析(LC-MS)对收集得到含有放射性硫的分离组分进行检测分析, 确定了大肠杆菌B7A中硫修饰的化学结构: DNA骨架上一个非桥联的氧原子被硫原子取代, 形成硫代磷酸二脂键。因此, 硫修饰的化学本质是DNA骨架上的磷硫酰化修饰。

1.5 DNA磷硫酰化修饰的位点特异性和立体选择性

在电泳过程中, 周秀芬等^[9]发现含磷硫酰化修饰的质粒pIJ101上的一个切割位点被切割的频率高于其它的切割位点, 这一现象间接反映了pIJ101上可能存在着优先修饰的区域。*dndB*的缺失会导致Dnd现象加剧, 梁晶丹等^[23]发现来自

dndB 缺失突变株HXY2的质粒pHZ209的优先修饰位点的选择性发生了改变。Dyson等^[18,23]提出, 变铅青链霉菌1326中的修饰发生在DNA双链上一个6 bp的回文中心序列中间隔2 bp的鸟嘌呤碱基上。除了这6 bp的核心序列外, 修饰的发生还需要更大范围区域的参与, 包含3个13 bp的正向重复: 左臂(LH)、右臂(RH)以及中心序列(Central)。除此之外, 还需要两段潜在的茎环结构/反向重复序列。由此可以推测, DNA磷硫酰化修饰的发生除了需要中心序列及侧翼DNA序列共存, 可能还需要一定的立体结构。

之后, 王连荣等^[24-25]用高效液相(HPLC)、高压液相质谱(LC-MS)及高精度的ESI-TOF MS等检测手段对含*dnd*基因簇的大肠杆菌B7A及变铅青链霉菌1326的DNA酶解产物进行分离、分析, 确定了大肠杆菌B7A中磷硫酰化修饰的分子结构为5'-d(G_{PS}A)-3', 而变铅青链霉菌1326中则为5'-d(G_{PS}G)-3', 二者皆为专一性的R_p空间构象。由此可见, DNA磷硫酰化修饰具有位点特异性和立体选择性。

1.6 DNA磷硫酰化修饰的广泛性及频率多样性

序列分析发现, 变铅青链霉菌1326中的*dnd*基因簇GC含量低于其基因组GC含量的平均值^[6]。对突变株ZX1缺失的含*dnd*基因簇的90 kb染色体片段及附近区域进行精确定位, 发现这段区域位于*murA1*基因3'端的基因岛上^[21-22]。而作为变铅青链霉菌的亲源菌株, 天蓝色链霉菌中并没有*dnd*基因簇, 且*murA1*基因是完整的, 3'端没有这个基因岛, 暗示着*dnd*基因簇是进化过程中通过水平基因转移进入变铅青链霉菌1326中的^[6,21,27]。欧竝宇、贺新义等^[27-28]对多株不同种属的细菌及古菌*dnd*同源基因簇进行分析, 发现这些菌株的*dnd*基因簇均位于可转移DNA元件上。由此推测, 在进化过程中, *dnd*同源基因簇首先被包含到可转移的DNA元件中, 在某些因素的刺激下, 随着可移动

的DNA元件在不同细菌中水平转移, 最终得以保存^[29]。

研究发现, *dnd*基因簇广泛分布于不同种属的微生物中, 这些微生物的栖息环境千差万别, 且相互之间并没有明显的亲缘关系^[8,27-28,30-35]。王连荣等^[36]发展了LC-MS/MS的检测方法, 将收集到的含*dnd*基因簇的代表性菌株的DNA进行了高敏检测和精细量化, 发现了d(C_{PS}A)、d(T_{PS}A)、d(A_{PS}A)、d(G_{PS}T)和d(C_{PS}C)等前所未有的修饰类型, 且它们的修饰频率也存在一定的差异。因此, DNA磷硫酰化修饰具有广泛性和频率多样性的特征。

2 DNA磷硫酰化修饰系统功能的发掘

2.1 Dnd蛋白功能鉴定

氨基酸同源性比对及保守结构域分析结果表明^[28], DndA可能是磷酸吡哆醛(PLP)依赖的半胱氨酸脱硫酶的同源蛋白^[33,37], 能够以半胱氨酸为底物, 催化产生丙氨酸和活性硫。研究证实, DndA确实具有脱硫酶活性^[38]。吴更等^[39]对来源于变铅青链霉菌1326的活性位点Cys327突变成Ser327后的DndA晶体进行了解析, 发现晶体中存在小分子PLP, PLP与Lys200以席夫碱共价键的形式结合在DndA蛋白的N端区域。由此可见, PLP在DndA蛋白作用过程中发挥着十分重要的作用。梁晶丹等^[40]发现, 一些能够产生磷硫酰化修饰的细菌基因组上却不含*dndA*基因, 可能是因为菌体本身分布在染色体DNA其它地方的半胱氨酸脱硫酶能够弥补磷硫酰化修饰生物途径中对DndA蛋白的需要。

生物信息学分析表明, DndB可能与核酸结合来行使调节功能^[6,23]。何威等^[41]证实, 沙门氏菌*S. enterica* serovar Cerro 87中的DndB以二聚体的形式与*dndBCDE*操纵子启动子区的2个回文序列

5'-TACGN10CGTA-3'结合,从而调控*dndCDE*及*dndB*自身基因的表达。其中Cys29在DndB与DNA的结合中起着关键作用。

DndC与硫代谢相关的2个关键酶: ATP硫酸化酶及3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸还原酶(PAPS reductase)具有很高的同源性^[6]。DndC含有4Fe-4S辅因子,与DndA有较强的相互作用,DndA可通过催化半胱氨酸产生活性硫,用于DndC铁硫簇的装配,激活其ATP焦磷酸活性^[38]。

生物信息分析结果显示,DndD与ABC转运蛋白中的ATP结合蛋白结构域有极高的同源性,推测其可能含有ATP酶活性,可以参与ATP水解,为DNA磷硫酰化修饰过程中DNA的切割提供能量^[6,25]。荧光假单胞菌Pfo-1中DndD同源蛋白SpfD有ATP水解酶活性^[42],可能参与DNA结构变化及缺口DNA的形成。

氨基酸序列比对显示,DndE与UCAIR合成酶的部分序列同源,这类蛋白可以与ATPase偶联形成酶复合物^[6,43],参与ATP的水解。曹春阳等^[44]对来自大肠杆菌B7A中的DndE同源蛋白晶体结构进行了解析,推测DndE蛋白是一种DNA结合蛋白,结合DndD切割形成的缺口DNA。

2.2 磷硫酰化修饰DNA的抗氧化性

谢新强等^[45-46]系统研究磷硫酰化修饰DNA(sDNA)与过氧化物的相互作用,揭示了磷硫酰化修饰DNA在电泳过程中发生化学反应降解的机制:(1) sDNA可以与氧化剂发生氧化还原反应,直接进行硫氧互换,氧化到正常的DNA,或者先被氧化到氢磷酸酯然后再被氧化到正常的DNA而不引起断裂降解;(2) sDNA被氧化剂氧化成氢磷酸酯DNA,然后发生水解而断裂。细菌中磷硫酰化修饰DNA能够作为抗氧化剂保护DNA免受氧化损伤,并消除部分氧化压力,赋予微生物在氧化逆境中的生存优势。

2.3 DNA磷硫酰化修饰位点在基因组水平的精确定位

利用单分子实时测序技术测定了大肠杆菌*E. coli* B7A和弧菌*Vibrio cyclitrophicus* FF75基因组水平DNA磷硫酰化修饰位点,首次获得了精确的细菌基因组磷硫酰化修饰位点分布图谱。对测序的数据进行分析显示^[47],大肠杆菌*E. coli* B7A基因组上的磷硫酰化修饰为双链修饰,修饰核心序列为G_{PS}AAC/G_{PS}TTC,而弧菌*V. cyclitrophicus* FF75的修饰则发生在CC_{PS}A序列上,并且是特征性的单链修饰。与甲基化修饰不同,磷硫酰化修饰在基因组上的修饰是以部分修饰的状态存在的,且在不同分子的同一个修饰位点上有时修饰有时不修饰。在B7A的40701个潜在的修饰位点中,仅有18%被修饰,其中4499个修饰位点位于基因内部,3个位于tRNA基因区,25个位于rRNA基因区,其余333位于非编码区;而在FF75的160541个可能的修饰位点中,仅有14%被修饰,其中有19005个修饰位点位于基因内部,151个位于tRNA基因区,761个位于rRNA基因区,其余1861个位于非编码区。因此,基因组上的磷硫酰化修饰属于动态的部分修饰。

2.4 DNA磷硫酰化修饰的修饰限制功能

原核生物中甲基化修饰的主要功能是限制修饰和DNA损伤修复^[48-49]。徐铁钢等^[35,50]在对*S. enterica* serovar Cerro isolate 87进行遗传操作时发现,不含磷硫酰化修饰的质粒很难转入*S. enterica* serovar Cerro 87中,而含磷硫酰化修饰质粒的转化效率却很高。进一步的研究发现,在*S. enterica* serovar Cerro 87修饰基因簇*dndBCDE*的下游存在一个转录相反的由4个基因构成的限制基因簇*dndFGHI*。在宿主DNA受到磷硫酰化修饰保护的情况下,DndFGHI蛋白会发挥限制作用,切割外来的不含磷硫酰化修饰的DNA。

为了探索DNA磷硫酰化修饰依赖限制系统的作用机理,曹博、甘睿等^[51-52]对*S. enterica* serovar

Cerro 87及其突变株进行了研究。结果表明,在修饰系统缺失后,限制系统的存在不具有致死效应,而是赋予突变株多种表型:核糖体蛋白、DNA修复蛋白、膜蛋白等在液体培养基中积累、菌体生长缓慢、菌落形态异常、细胞分裂受阻导致细胞变长、细胞膜受到损伤等。进一步研究基因组转录谱发现,与野生型相比,突变株中参与DNA损伤修复和SOS应激反应等过程的600多个基因的转录发生了明显变化,这与宿主所呈现的异常生理表型十分吻合。

由此可见,DNA磷硫酰化修饰限制系统有着特殊的保护机制,可以维持自身基因组的稳定性,其表达在细胞内是受到严格调控的。这一研究不仅拓展了对DNA磷硫酰化修饰生理功能的认识,而且加深了人们对自然界中基因组防御系统多样性的理解和认识。

3 研究展望

3.1 DNA磷硫酰化修饰的研究意义

DNA磷硫酰化修饰是继DNA甲基化修饰之后,在DNA上发现的又一种表观遗传学修饰,是发生在DNA骨架上的第一例生理修饰,是对天然DNA结构理论的进一步完善。S元素的引入,打破了DNA是由C、H、O、N、P 5种元素构成的固有思维,对DNA分子结构的组成元素有了新的补充。

*dnd*基因簇位于可移动DNA元件上,这暗示DNA磷硫酰化修饰的广泛存在是生物在进化过程中物质交流的结果,这些多样化*dnd*基因簇可能源自一个共同的祖先。对不同生活环境下微生物的磷硫酰化修饰进行研究,解析*dnd*基因簇可能的进化过程、规律以及进化推动力,将可能揭示*dnd*基因簇的起源,为阐明磷硫酰化修饰的生物学意义提供启示。

作为基因治疗的手段之一,人工合成的磷硫酰化寡聚核苷可作为癌症基因表达和病毒复制的抑制剂,一直是近年来研究的热点。天然存在的

DNA磷硫酰化修饰可能会在药物研究开发、药物生产程序简化及药物成本控制等生物技术领域发挥作用,也将在DNA损伤修复甚至癌症治疗因子的作用机理研究方面提供新的思路。DNA磷硫酰化修饰的研究,将进一步丰富分子生物学的基础理论,从遗传学、生物化学、结构生物学等领域对其进行研究,可能推动其它领域如基因治疗^[53-55]、环境治理、生物学和药学等的发展,具有重要的生物学或生物工程学意义。

3.2 DNA磷硫酰化修饰研究的机遇与挑战

基于免培养的分子生态学技术不断发展,有利于绘制DNA磷硫酰化修饰在广泛环境中存在的全景图,解读磷硫酰化修饰的进化历程及迁移路径,探索*dnd*基因簇的起源、分化动力以及在自然界的分布特征。同时,研究技术如单分子实时测序技术等不断发展进步都将为磷硫酰化修饰的科学研究带来新的机遇,基因组上磷硫酰化修饰的精确定位将极大地推动DNA磷硫酰化修饰的生物学功能研究,有利于进一步了解并揭示这一特殊表观遗传学修饰的生理生化过程。

作为一种新型的表观遗传,近年来,DNA磷硫酰化修饰越来越受到关注,研究成果不断涌现,然而,这些发现只是冰山一角,关于磷硫酰化修饰的具体机制及生理意义仍需要更加深入的研究。*dnd*基因簇所编码的5个蛋白,是怎样协同将S原子掺入到DNA骨架上的?含*dnd*基因簇的微生物在对其DNA进行修饰的过程中,是如何特异性地选择修饰位点的?作为一种新型的表观遗传,DNA磷硫酰化修饰是否会参与细菌中特定基因的表达?是否会参与不同生长阶段、不同环境压力下基因差异应答的调控从而提高细菌在环境中的适应性?在一些细菌如*S. enterica* serovar Cerro 87中,依赖修饰系统的限制系统,又是怎样在这种部分修饰的情况下,避免对自身未经修饰的位点进行切割的?这一系列问题仍需在未来进行更加深入的研究。

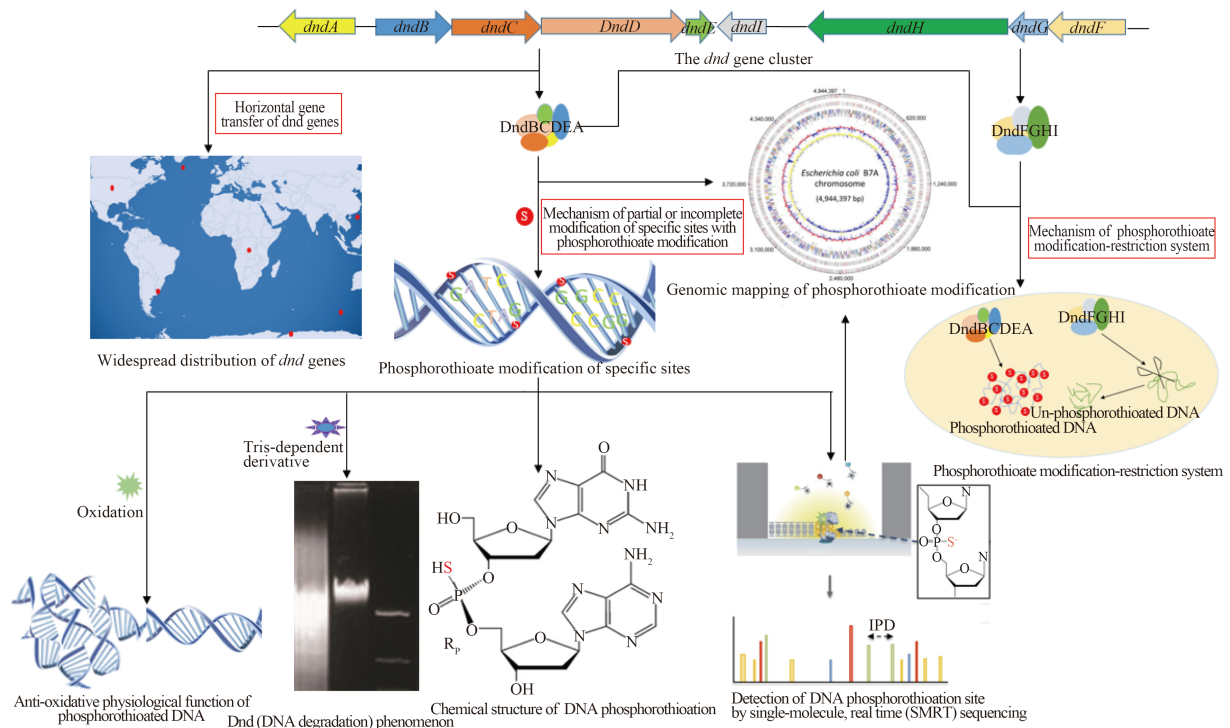


图 1. 基因组磷硫酰化修饰的研究进展及未来的研究方向

Figure 1. The research progress and future research directions of genomic phosphorothioate modification.

参考文献

- [1] Hershey AD, Chase M. Independent functions of protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 1952, 36(1): 39–56.
- [2] Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171(4356): 737–738.
- [3] Gold M, Hurwitz J, Anders M. The enzymatic methylation of RNA and DNA. I. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1963, 11(2): 107–114.
- [4] Donahue JP, Peek RM. Restriction and modification systems//Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, DC: The American Society for Microbiology Press, 2001.
- [5] Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(8): 597–610.
- [6] Zhou XF, He XY, Liang JD, Li AY, Xu TG, Kieser T, Helmann JD, Deng ZX. A novel DNA modification by sulphur. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1428–1438.
- [7] Eckstein F, Gish G. Phosphorothioates in molecular biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 1989, 14(3): 97–100.
- [8] Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 1984, 12(1): 19–36.
- [9] Zhou XF, Deng ZX, Firmin JL, Hopwood DA, Kieser T. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(10): 4341–4352.
- [10] Kieser HM, Kieser T, Hopwood DA. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(17): 5496–5507.
- [11] Evans M, Kaczmarek FS, Stutzman-Engwall K, Dyson PC. Characterization of a *Streptomyces-lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology*, 1994, 140(6): 1367–1371.
- [12] 张劭翀. 除虫链霉菌DNA降解基因簇add的定位和异源表达. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 1999.
- [13] Ray T, Mills A, Dyson P. Tris-dependent oxidative DNA strand

- scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, 16(1): 888–894.
- [14] Evans M, Dyson PC. Pulsed-field gel electrophoresis of *Streptomyces lividans* DNA. *Trends in Genetics*, 1993, 9(3): 72.
- [15] Ray T, Weaden J, Dyson PC. Tris-dependent site-specific cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 75(2/3): 247–252.
- [16] Warren RAJ. Modified bases in bacteriophage DNAs. *Annual Review of Microbiology*, 1980, 34(1): 137–158.
- [17] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(17): 3640–3659.
- [18] Dyson P, Evans M. Novel post-replicative DNA modification in *Streptomyces*: analysis of the preferred modification site of plasmid pIJ101. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(5): 1248–1253.
- [19] Zhou XF, Deng ZX, Hopwood DA, Kieser T. *Streptomyces lividans* 66 contains a gene for phage resistance which is similar to the phage λ ea59 endonuclease gene. *Molecular Microbiology*, 1994, 12(5): 789–997.
- [20] Zhou XF, Deng ZX, Hopwood DA, Kieser T. Characterization of phi HAU3, a broad-host-range temperate streptomyces phage, and development of phasmids. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(7): 2096–2099.
- [21] Zhou XF, He XY, Li YA, Lei F, Kieser T, Deng ZX. *Streptomyces coelicolor* A3(2) lacks a genomic island present in the chromosome of *Streptomyces lividans* 66. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7110–7118.
- [22] 李爱英. 变铅青链霉菌DNA异常修饰系统的分子生物学研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2000.
- [23] Liang JD, Wang ZJ, He XY, Li JL, Zhou XF, Deng ZX. DNA modification by sulfur: analysis of the sequence recognition specificity surrounding the modification sites. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 2944–2954.
- [24] Wang LR, Chen S, Xu TG, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou XF, You DL, Deng ZX, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11): 709–710.
- [25] 王连荣. *dnd*基因簇对细菌DNA骨架的磷硫酰化硫修饰. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2007.
- [26] Pang B, Zhou X, Yu H, Dong M, Taghizadeh K, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Dedon PC. Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8): 1807–1813.
- [27] He XY, Ou HY, Yu Q, Zhou XF, Wu J, Liang JD, Zhang W, Rajakumar K, Deng ZX. Analysis of a genomic island housing genes for DNA S-modification system in *Streptomyces lividans* 66 and its counterparts in other distantly related bacteria. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 1034–1048.
- [28] Ou HY, He XY, Shao YC, Tai C, Rajakumar K, Deng ZX. *dndDB*: a database focused on phosphorothioation of the DNA backbone. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5132.
- [29] Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(1): 14–56.
- [30] Murase T, Nagato M, Shirota K, Katoh H, Otsuki K. Pulsed-field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar livingstone and serovar cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99(2): 139–143.
- [31] Liesegang A, Tschäpe H. Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002, 291(8): 645–648.
- [32] Koort JMK, Lukinmaa S, Rantala M, Unkila E, Siitonen A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(9): 3497–3498.
- [33] Lauhon CT, Kambampati R. The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(26): 20096–20103.
- [34] Silbert S, Boyken L, Hollis RJ, Pfaller MA. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003, 47(4): 619–621.
- [35] 徐铁钢. 细菌DNA磷硫酰化修饰与限制. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2008.
- [36] Wang LR, Chen S, Vergin KL, Giovannoni SJ, Chan SW, DeMott MS, Taghizadeh K, Cordero OX, Cutler M, Timberlake S, Alm EJ, Polz MF, Pinhassi J, Deng ZX, Dedon PC. DNA phosphorothioation is widespread and quantized in bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 2963–2968.
- [37] Zheng LM, White RH, Cach VL, Jack RF, Dean DR. Cysteine

- desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(7): 2754–2758.
- [38] You DL, Wang LR, Yao F, Zhou XF, Deng ZX. A novel DNA modification by sulfur: DndA is a NifS-like cysteine desulfurase capable of assembling DndC as an iron-sulfur cluster protein in *Streptomyces lividans*. *Biochemistry*, 2007, 46(20): 6126–6133.
- [39] Chen FK, Zhang ZY, Lin K, Qian TL, Zhang Y, You DL, He XY, Wang ZJ, Liang JD, Deng ZX, Wu G. Crystal structure of the cysteine desulfurase DndA from *Streptomyces lividans* which is involved in DNA phosphorothioation. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36635.
- [40] An XH, Xiong W, Yang Y, Li FH, Zhou XF, Wang ZJ, Deng ZX, Liang JD. A novel target of IscS in *Escherichia coli*: participating in DNA phosphorothioation. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51265.
- [41] He W, Huang T, Tang Y, Liu YH, Wu XL, Chen S, Chan W, Wang YJ, Liu XY, Chen S, Wang LR. Regulation of DNA phosphorothioate modification in *Salmonella enterica* by DndB. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12368.
- [42] Yao F, Xu TG, Zhou XF, Deng ZX, You DL. Functional analysis of *spfD* gene involved in DNA phosphorothioation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1. *FEBS Letters*, 2009, 583(4): 729–733.
- [43] Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Ikeuchi M, Katoh H, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP–1. *DNA Research*, 2002, 9(4): 123–130.
- [44] Hu W, Wang CK, Liang JD, Zhang TL, Hu ZP, Wang ZJ, Lan WX, Li F, Wu HM, Ding JP, Wu G, Deng ZX, Cao CY. Structural insights into DndE from *Escherichia coli* B7A involved in DNA phosphorothioation modification. *Cell Research*, 2012, 22(7): 1203–1206.
- [45] 谢新强. 磷硫酰化DNA在细菌中作为抗氧化剂的机制研究. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2012.
- [46] Xie XQ, Liang JD, Pu TN, Xu F, Yao F, Yang Y, Zhao YL, You DL, Zhou XF, Deng ZX, Wang ZJ. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18): 9115–9124.
- [47] Cao B, Chen C, DeMott MS, Cheng QX, Clark TA, Xiong XL, Zheng XQ, Butty V, Levine SS, Yuan G, Boitano M, Luong K, Song Y, Zhou XF, Deng ZX, Turner SW, Korch J, You DL, Wang LR, Chen S, Dedon PC. Genomic mapping of phosphorothioates reveals partial modification of short consensus sequences. *Nature Communications*, 2014, 5: 3951.
- [48] Arber W, Linn S. DNA modification and restriction. *Annual Review of Biochemistry*, 1969, 38: 467–500.
- [49] Arber W, Wauters-Willems D. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X II. The two restriction and modification systems of strain 15T. *Molecular and General Genetics*, 1970, 108(3): 203–217.
- [50] Xu TG, Yao F, Zhou XF, Deng ZX, You DL. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20): 7133–7141.
- [51] Cao B, Cheng QX, Gu C, Yao F, DeMott MS, Zheng XQ, Deng ZX, Dedon PC, You DL. Pathological phenotypes and *in vivo* DNA cleavage by unrestrained activity of a phosphorothioate-based restriction system in *Salmonella*. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(4): 776–785.
- [52] Gan R, Wu XL, He W, Liu ZH, Wu SJ, Chen C, Chen S, Xiang QR, Deng ZX, Liang DQ, Chen S, Wang LR. DNA phosphorothioate modifications influence the global transcriptional response and protect DNA from double-stranded breaks. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6642.
- [53] Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical. *Science*, 1993, 261(5124): 1004–1012.
- [54] Putney SD, Benkovic SJ, Schimmel PR. A DNA fragment with an alpha-phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(12): 7350–7354.
- [55] Stein CA. Exploiting the potential of antisense: beyond phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Chemistry & Biology*, 1996, 3(5): 319–323.

Research progress and prospects of phosphorothioate modification - A review

Yali Gao, Zixin Deng, Shi Chen *

School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China

Abstract: DNA phosphorothioate modification was the first reported physiological modification in the DNA backbone. Five putative proteins encoded by the five-member *dndABCDE* gene cluster replaced the non-bridging oxygen in the sugar-phosphate backbone with a sulfur. Phosphorothioate modification occurs in sequence-selective and *Rp* stereo-specific manner in diverse bacterial stains. In recent years, researchers have made systemic achievements in this area. To have a comprehensive understanding of this unusual modification, we reviewed the discovery and research progress in DNA phosphorothioate modification and also discussed opportunities and challenges in the future.

Keywords: phosphorothioate modification, modification on DNA backbone

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31520103902, 31170070, 31222001, 31170049)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68756643; E-mail: shichen@whu.edu.cn

Received: 2 April 2016; Revised: 17 May 2016; Published online: 6 June 2016