



极端嗜热古菌核酸内切酶III的研究进展

汤承轩^{1#}, 李祎禧^{1#}, 张立奎^{1,2*}

1 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127

2 扬州大学广陵学院, 江苏 扬州 225128

汤承轩, 李祎禧, 张立奎. 极端嗜热古菌核酸内切酶III的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(7): 2466–2477.

Tang Chengxuan, Li Yixi, Zhang Likui. Research progress in endonuclease III of hyperthermophilic archaea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2466–2477.

摘要: 胸腺嘧啶乙二醇(thymine glycol, Tg)是常见的氧化性 DNA 损伤碱基之一。DNA 中的 Tg 能够分别阻止 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶进行 DNA 复制和转录,导致相应的生物学过程终止,进而会引起细胞的死亡,因此 DNA 中的 Tg 需要被修复。核酸内切酶III (endonuclease III, EndoIII) 是一种双功能 DNA 糖苷酶,能够切除 DNA 中的 Tg,从而启动碱基切除修复途径进行修复 DNA 中的 Tg。细菌、古菌和真核生物的基因组序列中均存在有 EndoIII蛋白的编码基因。目前,源自于细菌和真核生物的 EndoIII已有较多的研究,而古菌 EndoIII的研究相对较少。基于目前已有的极端嗜热古菌 EndoIII的研究报道,本文综述了极端嗜热古菌 EndoIII的研究进展,并展望了今后的研究方向。

关键词: 极端嗜热古菌; 核酸内切酶III; 胸腺嘧啶乙二醇; 碱基切除修复

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20191219); 国家级大学生创新创业训练计划(202111117005Z)

Supported by the Provincial Natural Science Foundation of Jiangsu (BK20191219) and by the National Practice Innovation Training Program for College Students (202111117005Z)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-514-89795882; E-mail: lkzhang@yzu.edu.cn

Received: 1 November 2021; Revised: 16 December 2021; Published online: 15 March 2022

Research progress in endonuclease III of hyperthermophilic archaea

TANG Chengxuan^{1#}, LI Yixi^{1#}, ZHANG Likui^{1,2*}

1 College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu, China

2 Guangling College, Yangzhou University, Yangzhou 225128, Jiangsu, China

Abstract: Thymine glycol (Tg) is one of the common oxidative DNA damage bases. It can stall DNA polymerase and RNA polymerase that perform DNA replication and transcription, thus leading to the termination of the corresponding biological processes and further causing cell death. Therefore, Tg in DNA needs to be repaired. Endonuclease III (EndoIII) is a bifunctional DNA glycosylase capable of excising Tg from DNA, thus initiating a base excision repair pathway for restoring Tg to a normal T base. The genomes of bacteria, archaea, and eukaryotes possess the gene encoding EndoIII. The available studies mainly focus on the EndoIII in bacteria and eukaryotes while rarely concern archaeal EndoIII. We reviewed the research progress on the EndoIII in hyperthermophilic archaea and proposed the future research directions in this field.

Keywords: hyperthermophilic archaea; endonuclease III; thymine glycol; base excision repair

DNA 中的胸腺嘧啶乙二醇(thymine glycol, Tg)是一种常见的氧化性 DNA 损伤碱基^[1]。细胞内代谢产生的自由基、外界环境的离子辐射以及其他的氧化性诱变剂均可导致 DNA 中 Tg 的形成。据估计, 每一个细胞中每天共能产生约 400 个 Tg 分子^[2]。在动物细胞内, DNA 中的 Tg 被认为是 DNA 氧化性损伤的标志^[3]。尽管 DNA 中的 Tg 引起基因突变的概率很低, 但是它能够阻止 DNA 聚合酶合成 DNA 以及 RNA 聚合酶合成 RNA, 进而导致 DNA 复制和转录过程的终止, 从而会引起细胞的死亡^[4-5]。因此, DNA 中的 Tg 需要被修复。

目前, 碱基切除修复(base excision repair, BER)是修复 DNA 中 Tg 的重要途径。核酸内切酶 III (endonuclease III, EndoIII)是一种双功能 DNA 糖苷酶, 能够切除 DNA 中的 Tg, 从而启动 BER 途径^[6]。EndoIII 首先于 1976 年在 *E. coli* 中被研究^[7], 后来的研究发现, 该酶能够作用

于 DNA 中的 Tg 及其他嘧啶衍生物(图 1A), 包括 5,6-dihydrothymine (DHT)、5,6-dihydrouracil (DHU)、5-hydroxycytosine (5hC)和 5-hydroxyuracil (5hU)等^[8-9]。最新的研究发现, EndoIII 还能够切割含有尿嘧啶的 DNA^[10]。最近, 有研究表明 *Campylobacter jejuni* EndoIII 作为 BER 途径的修复酶, 负责 DNA 损伤的修复^[11]。细菌、古菌和真核生物的基因组序列中均存在有 EndoIII 蛋白的编码基因。目前, 源自真核生物的 EndoIII 也得到了广泛的研究, 包括人类 EndoIII、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* EndoIII 和鼠类 EndoIII^[12-17], 其中对人类 EndoIII 的结构与功能研究较为清楚。这些研究结果表明, 真核生物 EndoIII 具有与 *E. coli* EndoIII 相似的空间结构、催化机制和底物作用范围。

EndoIII 为一种双功能 DNA 糖苷酶, 具有 DNA 糖苷酶活性和 apurinic/apyrimidinic (AP) 裂合酶活性。EndoIII 利用其 DNA 糖苷酶活性

切除 DNA 中的 Tg, 从而产生 AP 位点, 并进一步利用其 AP 裂合酶活性对 AP 位点进行切割, 产生带有 3'- α,β -不饱和醛和 5'-磷酸的缺口 DNA (图 1B)。EndoIII 的 DNA 糖苷酶活性和 AP 裂合酶活性通过形成 Schiff 碱基中间体相偶联 (图 1B)。目前, 对细菌和真核生物中的 EndoIII 已有大量的研究报道, 它们具有相似的底物作用范围、晶体结构和催化机制。古菌在细胞构造方面相似于细菌, 而在遗传信息传递方面类似于真核生物, 尤其在 DNA 复制和 DNA 修复方面, 古菌是真核生物理想的简化版本^[18]。极端嗜热古菌基因组存在 EndoIII 蛋白的编码基因, 但是目前相关的研究相对较少。本文在已有的研究基础上, 综述了极端嗜热古菌 EndoIII 的研究进展, 并对今后的研究进行了展望。

1 EndoIII 的研究概况

通过氨基酸序列比对发现, 不同来源的

EndoIII 具有 2 个高度保守的结构域: 螺旋-发夹-螺旋(helix-hairpin-helix, HhH)和铁硫簇环(Fe-S cluster loop, FCL) (图 2)。因此, EndoIII 属于富含甘氨酸/脯氨酸和高度保守的天冬氨酸序列(a glycine/proline-rich sequence followed by an absolutely conserved aspartate, HhH-GPD)超家族^[19]。最近, Kanchan 等对 463 个 EndoIII 同源蛋白的基因序列进行比对和进化关系分析发现, EndoIII 具有在结构和功能方面都起着重要作用的 HhH 结构域和 FCL, 并且水平基因转移在该酶进化过程中扮演着重要的角色^[20]。EndoIII HhH 结构域由 2 个 α -螺旋和一段连接这 2 个 α -螺旋的 loop 组成, 其中 loop 包含保守的甘氨酸-疏水残基-甘氨酸(GhG)氨基酸残基。突变分析结果表明, *E. coli* EndoIII HhH 结构域中 K120、*Deinococcus radiodurans* EndoIII2 HhH 结构域中 K132、*Bacillus stearothermophilus* EndoIII HhH 结构域

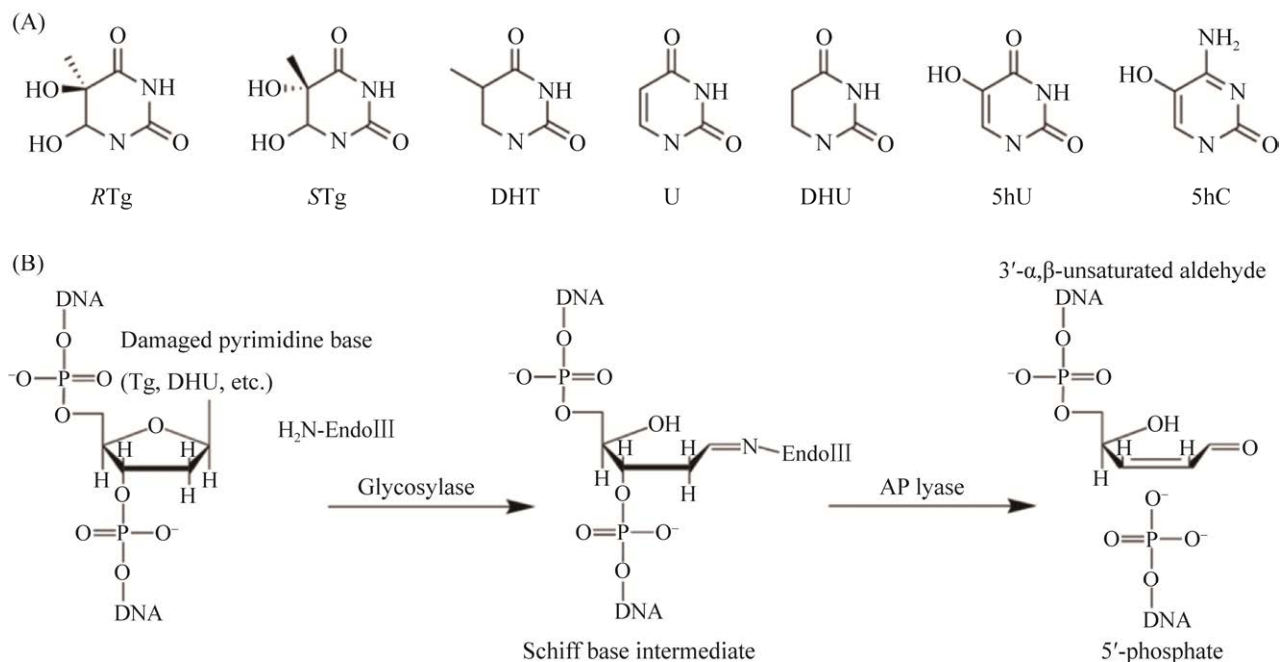


图 1 EndoIII 切除的损伤嘧啶碱基(A)及其催化机理(B)

Figure 1 Damaged pyrimidine bases excised by EndoIII (A) and its catalytic mechanism (B).

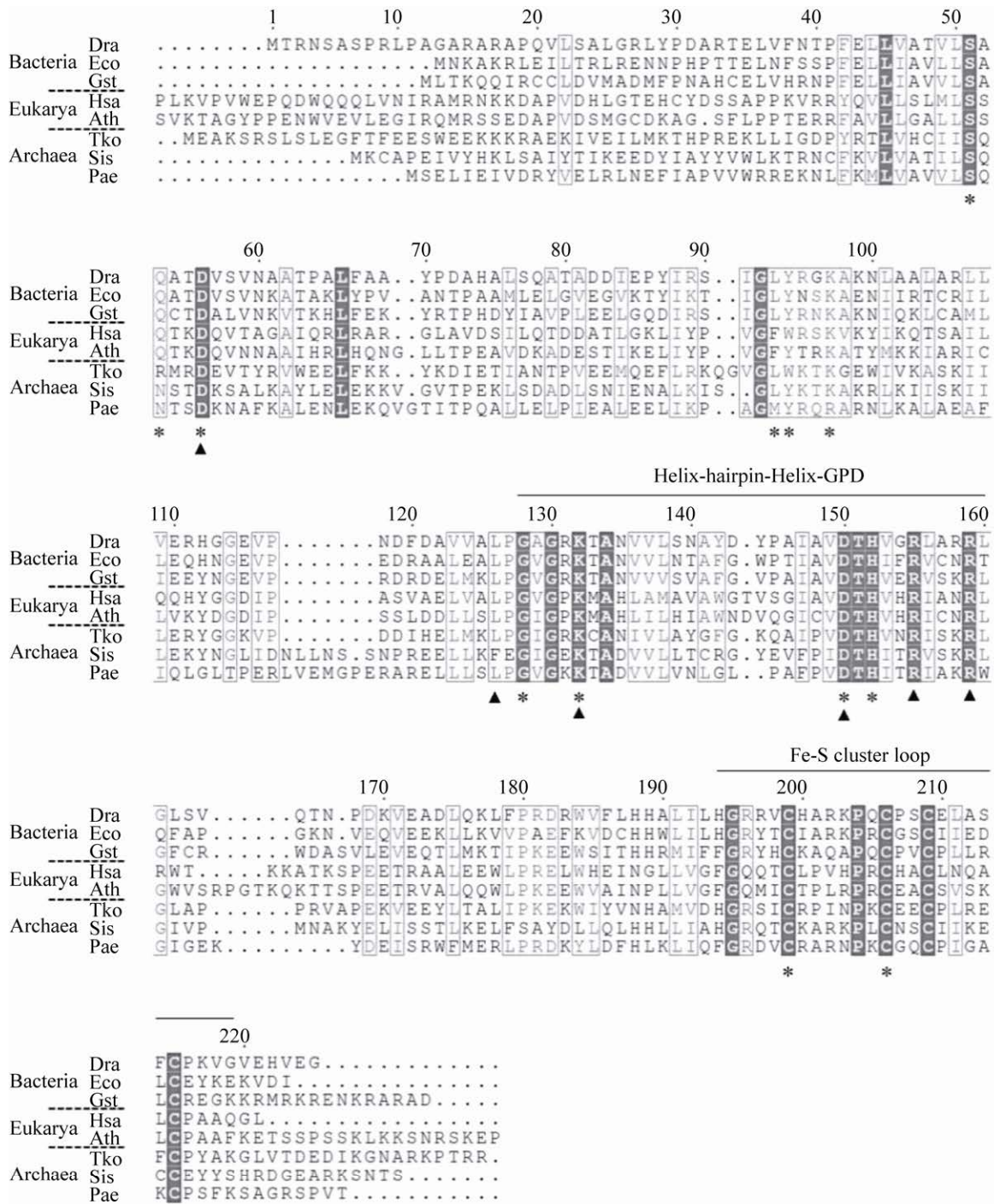


图 2 细菌、真核生物和古菌的 EndoIII 蛋白的氨基酸序列比对

Figure 2 Alignment of amino acid sequences of bacterial, eukaryotic and archaeal EndoIII proteins. * and ▲ represent the mutational sites of Tko-EndoIII and Sis-EndoIII. Dra2: *Deinococcus radiodurans* (AAF09870); Eco: *Escherichia coli* (THI74517); Gst: *Geobacillus stearothermophilus* (KYD34886); Hsa: *Homo sapiens* (AAB41534); Ath: *Arabidopsis thaliana* (CAC16135); Sis: *Sulfolobus islandicus* (WP_014514102); Pae: *Pyrobaculum aerophilum* (AAF37269); Tko: *Thermococcus kodakarensis* (BAD85330).

中 K121 的 ϵ -氨基直接参与 Schiff 碱中间体的形成和 β -消除反应^[21-23]。另外, 人类 EndoIII HhH 结构域中 K212 具有偶联 DNA 糖苷酶和 AP 裂合酶的活性^[24]。因此, EndoIII HhH 结构域中保守的赖氨酸残基是该酶发挥活性的关键氨基酸残基。除了保守的赖氨酸残基之外, EndoIII HhH 结构域中存在另一个对催化活性至关重要的、高度保守的天冬氨酸残基, 例如 *B. stearothermophilus* EndoIII 中的 D139、*E. coli* EndoIII 中的 D138 和 *D. radiodurans* EndoIII2 中的 D150^[21-23]。2018 年, Moe 等分析了失活的 *D. radiodurans* EndoIII2 双突变体 K132A/D150A 与正常 DNA 相互作用和有活性的野生型蛋白与损伤 DNA 的相互作用, 结果表明该酶-DNA 复合物的细微差别调控着电子迁移^[25]。

如图 2 所示, FCL 位于 EndoIII 蛋白的 C 端, 含有 4 个保守的 Cys, 该结构域不仅维持该蛋白结合 DNA 的作用^[21-22,26], 而且还能通过依赖 DNA 结合的氧化还原活性有效地检测出损伤碱基^[27]。*E. coli* EndoIII FCL 中的 4 个半胱氨酸 (Cys187、Cys194、Cys197 和 Cys203) 已被确定为簇状配体^[20-21,27], 参与定位 DNA 中 Tg 的磷酸二酯键的作用^[28]。Ekanger 等研究了 EndoIII 的 FCL 亚硝基化, 揭示了一氧化氮在 FCL 亚硝基化时通过 800 mV 负移调节 EndoIII 的氧化还原活性^[29]。因此, EndoIII 的 FCL 负责该酶的氧化还原活性^[30]。

大多数细菌基因组编码单个 EndoIII 的基因, 而 *D. radiodurans* 编码 3 个 EndoIII 同源蛋白: DR2438 (*D. radiodurans* EndoIII1)、DR0289 (*D. radiodurans* EndoIII2) 和 DR0982 (*D. radiodurans* EndoIII3)。研究发现, *D. radiodurans* EndoIII2 类似于已报道的 *E. coli* EndoIII 蛋白, 而 *D. radiodurans* EndoIII1 对含有 Tg 或 AP 的 DNA 底物表现出微弱的活性, 并且与 *D. radiodurans*

EndoIII2 蛋白的亲缘关系较远。相应地, 尽管 *D. radiodurans* EndoIII3 具有保守的催化残基, 但是不具有切割含有 Tg 或 AP 的 DNA 底物的活性, 这暗示着它与 *D. radiodurans* EndoIII1 和 *D. radiodurans* EndoIII2 蛋白的亲缘关系最远^[31]。

如图 3 所示, EndoIII 分布在古菌、细菌和真核生物中, 其中包括极端嗜热细菌和古菌。有趣的是, 极端嗜热细菌 *Thermotoga naphophila* EndoIII 和 *Thermotoga maritima* EndoIII 与极端嗜热广古菌 EndoIII 具有较近的亲缘关系, 然而极端嗜热细菌 *Thermus thermophilus* EndoIII 与非嗜热细菌 EndoIII 亲缘关系较近。此外, *D. radiodurans* EndoIII1 和 *D. radiodurans* EndoIII3 表现出与极端嗜热古菌 EndoIII 较近的亲缘关系。

2 EndoIII 的结构特征

目前, 已有 4 种 EndoIII 蛋白晶体结构得到解析, 分别是 *E. coli*、*B. stearothermophilus*、*D. radiodurans* EndoIII1 和 N 端去除 76 个氨基酸的截短蛋白 *D. radiodurans* EndoIII3 Δ 76。这些 EndoIII 蛋白在空间结构上非常相似, 暗示着它们具有相似的催化机制, 但是它们在结构方面也存在着差异。

E. coli EndoIII 的晶体结构显示, 该酶的 HhH 结构域、FCL 和用于结合 DNA 氨基酸残基 R191, 构成了底物口袋, 能够容纳 DNA 底物, 并且包含在底物口袋中被翻转的损伤碱基^[21]。负责该酶催化的氨基酸残基 K120 和 D138 位于底物口袋的开口处, 暗示这个底物口袋是该酶的活性中心。此外, *E. coli* EndoIII 中的 S39、D44 和 R184 围绕在 DNA 中 Tg 周围, 这 3 个氨基酸残基在其他 EndoIII 蛋白中高度保守。突变分析结果表明, S39L 突变体具有 AP 裂合酶活性, 但是不具有 DNA 糖苷酶活性^[32]。

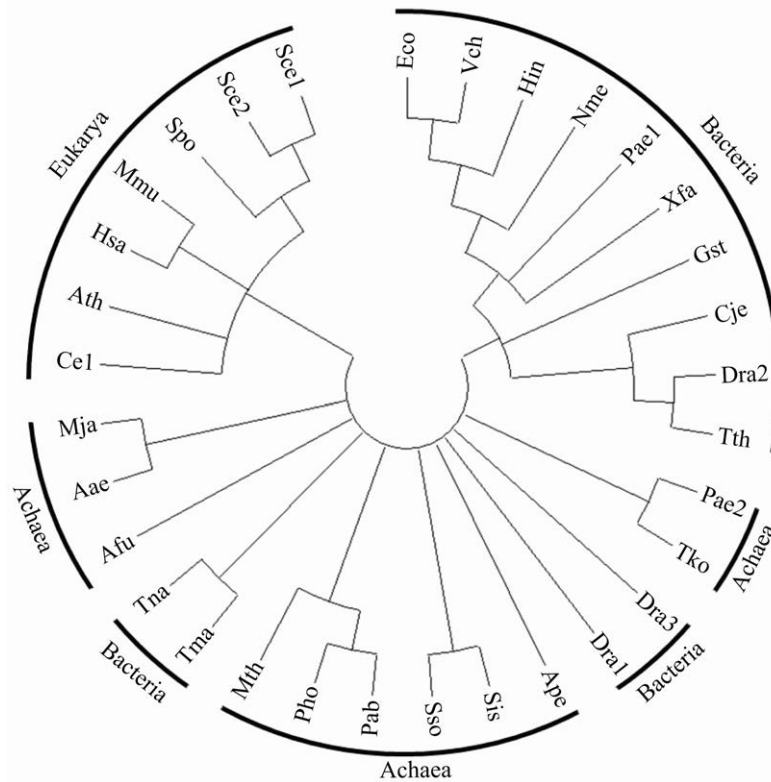


图 3 EndoIII 的系统发育分析(由于篇幅的限制, 该系统发育树仅包括部分古菌、细菌和真核生物)

Figure 3 Phylogenetic analyses of EndoIII. Only partial bacteria, archaea, and eukarya are included in the phylogenetic tree due to the space limit. Aae: *Aquifex aeolicus* (AAC06594); Afu: *Archaeoglobus fulgidus* (KUK06154); Ape: *Aeropyrum pernix* (BAA79061); Ath: *A. thaliana* (CAC16135); Cel: *Caenorhabditis elegans* (P54137); Cje: *Campylobacter jejuni* (ALK81184); Dra1: *D. radiodurans* R1 (AAF11977); Dra2: *D. radiodurans* (AAF09870); Dra3: *D. radiodurans* R1 (AAF10559); Eco: *E. coli* (THI74517); Gst: *G. stearothermophilus* (KYD34886); Hin: *Haemophilus influenzae* (P44319); Hsa: *H. sapiens* (AAB41534); Mja: *Methanococcus jannaschii* (AAB98606); Mmu: *Mus musculus* (BAA22080); Mth: *Methanobacterium thermoautotrophicum* (AAB85267); Nme: *Neisseria meningitidis* MC58 (AAF40962); Pab: *Pyrobaculum abyssi* (A75109); Pae1: *Pseudomonas aeruginosa* (AAG06883); Pae2: *P. aerophilum* (AAF37269); Pho: *Pyrococcus horikoshii* (WP_010885578); Sce1: *Saccharomyces cerevisiae* (GFP64588); Sce2: *S. cerevisiae* (GFP69027); Sis: *S. islandicus* (WP_014514102); Spo: *Schizosaccharomyces pombe* (CAA91893); Sso: *Sulfolobus solfataricus* (CAA69576); Tko: *T. kodakarensis* (BAD85330); Tma: *Thermotoga maritima* (Q9WYK0); Tna: *Thermotoga naphthophila* (KUK22165); Tth: *Thermus thermophilus* (BAW01624); Vch: *Vibrio cholerae* (AAF94172); Xfa: *Xylella fastidiosa* (AAF83457).

相反, D44V 突变体具有 DNA 糖苷酶活性, 但是 AP 裂合酶的活性显著低于野生型蛋白, 表明 D44 为 β -消除反应所必需。另外, R184A 突变体保留 AP 裂合酶活性, 但是表现出不同于野生型蛋白的底物专一性。

B. stearothermophilus EndoIII 与 DNA 形成复合物的晶体结构显示, 氨基酸残基 D45、G119、Y122、Y140、H141 和 R140 作用于损伤链, 而氨基酸残基 R78、S79、Y83、R84 和 N85 作用于损伤链的互补链^[21]。另外,

B. stearothermophilus EndoIII中的 L82、E42 和 I80 共同作用把损伤碱基从 DNA 中翻转出来^[25]。与 *B. stearothermophilus* EndoIII中的 L82 相似, *E. coli* EndoIII中的 L81 是识别损伤碱基的一个关键氨基酸残基^[33]。Kuznetsov 等利用预稳态动力学揭示了 *E. coli* EndoIII中的 N41 和 Leu81 是作为损伤位点感应器参与识别 DNA 中损伤的碱基^[34]。

D. radiodurans EndoIII1 和 N 端截短蛋白 *D. radiodurans* EndoIII3Δ76 的结构显示, 它们包含保守的 HhH 结构域和 FCL^[23], 这些结构特征与 *E. coli* 和 *B. stearothermophilus* 的 EndoIII类似。但是, *D. radiodurans* EndoIII1 和 *D. radiodurans* EndoIII3 的 HhH 结构域包含额外的螺旋特征和静电表面电位。

3 极端嗜热古菌 EndoIII

3.1 极端嗜热古菌 *A. fulgidus* EndoIII

目前, 关于古菌 EndoIII蛋白的研究相对较少。极端嗜热古菌 *A. fulgidus* 是参与硫代谢的广古菌, 其基因组存在 EndoIII同源蛋白的基因^[35]。*A. fulgidus* EndoIII是古菌中第一个被报道的 EndoIII^[36]。NMR 结构显示, *A. fulgidus* EndoIII包含 5 个结构元件: HhH 结构域、FCL 结构域、非 HhH 结构域、helix B–helix C 环和 helix H, 这些元件形成了跨越酶活性中心的连续表面。

3.2 极端嗜热古菌 *Pyrobaculum aerophilum* EndoIII

极端嗜热古菌 *P. aerophilum* 是一种需氧的泉古菌, 其最适生长温度为 100 °C, 分离于深海热液口。研究发现, *P. aerophilum* EndoIII (Pae-EndoIII)是热稳定的 EndoIII蛋白, 具有 DNA 糖苷酶/AP 裂合酶的双功能活性, 能够在高温条件下切除 DNA 中的 DHT, 尤其是对切

除 DNA 中 DHT:G 配对的 DHT 效率最高^[37]。进一步的研究发现, 该酶切除 DNA 中 DHT 的最适反应温度为 70 °C, 并且存在 80–100 mmol/L NaCl 的条件下, 该酶活性最高。系统发育分析, Pae-EndoIII被聚类为 EndoIII的 5 个超家族。

3.3 极端嗜热古菌 *Thermococcus* EndoIII

极端嗜热古菌 *Thermococcus gammatolerans* 是一种厌氧的广古菌, 其最适生长温度为 88 °C, 也是目前所发现的最耐辐射古菌, 其 TGAM_1277 基因编码 EndoIII同源蛋白^[38]。研究发现, *T. gammatolerans* EndoIII同源物具有切割含有 8-oxoguanine (8oxoG)、5-hydroxyhydantoin (5-OH-dHyd)和 5-hydroxy-5-methylhydantoin (5-OH-5-Me-dHyd) DNA 的活性^[39]。另外, 遗传学结果表明, γ 射线照射 *T. gammatolerans* 细胞会导致 TGAM_1277 基因的表达明显增加, 暗示着该基因编码的 EndoIII同源物负责修复由于 γ 射线照射细胞而造成的 DNA 损伤碱基。

极端嗜热古菌 *Thermococcus kodakarensis* 具有易培养、易于遗传操作的特点, 是研究极端嗜热古菌的模式生物之一^[40]。研究发现, 极端嗜热古菌 *T. kodakarensis* (Tko-EndoIII)能够切割 DNA 中如下的损伤碱基: STg、RTg、5hC、5hU、DHT 和 DHU, 但是不能切割正常的碱基和其他损伤碱基, 包括 O⁶-methylguanine (6mG)、hypoxanthine (Hx)和 8oxoG 等^[41]。另外, Tko-EndoIII切割含有 Tg 的 dsDNA 活性明显高于含有 Tg 的 ssDNA, 暗示着该酶负责基因组 DNA 中 Tg 的修复。这一特征与 *E. coli*、老鼠和人类的 EndoIII功能相同, 表明 EndoIII具有功能进化的保守性。

与其他来源的 EndoIII相比, 古菌 EndoIII 具有不同的 DNA 底物作用范围。例如中度嗜热古菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* EndoIII同源物 Mt0764 不仅能够切除 DNA 中的

Tg, 而且还能够切除 DNA 中的 8oxoG^[42]。同样, 极端嗜热古菌 *T. gammatolerans* EndoIII 同源物 TGAM_1277 也能够识别并切除 DNA 中的 8oxoG。但是, Tko-EndoIII 不能够切除 DNA 中的 8oxoG。最新的研究发现, EndoIII 的 DNA 糖苷酶活性能够作用于含有尿嘧啶的 DNA^[10], 然而 Tko-EndoIII 对含有尿嘧啶的 DNA 仅表现出微弱的活性^[39]。因此, 古菌 EndoIII 能够多样化地作用损伤碱基。

凝胶阻滞实验结果显示, Tko-EndoIII 表现出对含有 Tg 的 dsDNA 比对正常 dsDNA 具有更高的结合力, 表明该酶与 DNA 形成复合物需要 Tg 的存在, 从而说明该酶与含有 Tg 的 dsDNA 的紧密结合是该酶高效率地切除 DNA 中 Tg 的关键。

动力学分析结果表明, Tko-EndoIII 对含有 Tg 的 DNA 的切割速率顺序如下: STg-dsDNA > STg-ssDNA > RTg-ssDNA, 但是尚未检测到该酶切割 RTg-dsDNA 的速率, 表明该酶对 STg-DNA 的切割效率明显高于对 RTg-DNA 的切割效率, 这与 *E. coli* EndoIII 一致^[43], 但是不同于人类和老鼠的 EndoIII^[43-44]。

突变分析结果表明, Tko-EndoIII 的氨基酸残基 K140 和 D158 是该酶 DNA 糖苷酶活性的关键氨基酸残基, S57 和 D62 是负责切割 AP 位点的氨基酸残基, H160 具有识别 Tg 的功能和与 DNA 相互作用的功能。另外, K105、R59、

L101、W102 和 G136 参与 DNA 相互作用。

3.4 冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*) REY15A EndoIII

冰岛硫化叶菌(*S. islandicus*) REY15A 分离于冰岛热泉, 其最适生长温度为 75 °C, 最适生长 pH 为 3.0, 具有易培养、遗传操作系统完善等特点, 是研究古菌 DNA 复制和修复的模式生物之一^[45-46]。我们实验室最近对 *S. islandicus* REY15A EndoIII (Sis-EndoIII) 切除 DNA 中 Tg 的生化性质和催化机理进行了探讨研究^[47]。生化数据表明, Sis-EndoIII 切割含有 Tg 的 dsDNA (Tg-dsDNA) 的最适温度为 70 °C, 最适 pH 为 7.0-8.0。在不存在二价金属离子的条件下, 该酶具有较弱的活性, 而存在 Mg²⁺ 或者 Ca²⁺ 时, 该酶具有最佳的切割活性。Sis-Endo III 与 Pae-EndoIII 具有相同的最适反应温度、热稳定性, 但是盐浓度对两者的活性影响不同(表 1)。

与其他已报道的 EndoIII 类似, 该酶具有 AP 裂合酶的活性, 并且在 NaBH₄ 存在下能够与 Tg-dsDNA 形成 Schiff 碱中间体复合物。另外, 我们对 Sis-EndoIII 切割 Tg-dsDNA 进行了动力学分析, 测试了在单转换条件下该酶在 50-70 °C 切割 Tg-dsDNA 的反应速率, 并进一步阐明了该酶切除 DNA 中 Tg 所需要的激活自由能(39.7±4.2 k_{cal}/mol)。

目前, 极端嗜热古菌 EndoIII 晶体结构尚未得到解析。为了阐明 Sis-EndoIII 的结构与

表 1 Sis-EndoIII 和 Pae-EndoIII 生化性质的比较

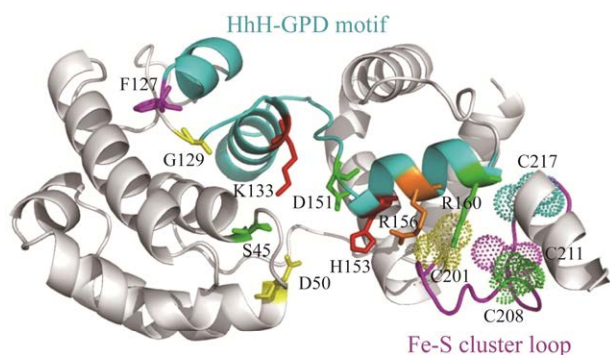
Table 1 Comparison of biochemical characteristics of Sis-EndoIII and Pae-EndoIII

EndoIII	Optimal temp./°C	Thermostability	Optimal pH	Divalent ion requirement	NaCl effect	References
Sis-EndoIII	70	Retaining 16% activity after heated at 80 °C for 20 min	6.0-8.0	Mg ²⁺ or Ca ²⁺ optimal	Retaining 40% activity at 400 mmol/L NaCl	[47]
Pae-EndoIII	60-70	Retaining activity after heated at 80 °C for 20 min	N.D.	Independent	Optimal activity at 80-160 mmol/L NaCl	[37]

N.D.: not determined.

功能的关系, 我们利用 SWISS MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org>) 对该酶进行了同源建模(图 4), 并在此基础上, 对 HhH-GPD 结构域中的氨基酸残基 F127、K133、D151、R156 和 R160 进行了突变, 构建了该酶 F127L、K133A、D151A、R156A、R160 和 D50A 突变体。切割实验结果表明, K133A 和 D151A 突变体仅保留很弱的活性, 而 F127L 和 R160L 突变体具有野生型蛋白的活性, 同时 D50A 和 R156A 突变体具有比野生型蛋白低的活性, 从而说明 K133 和 D151 是负责该酶切除 DNA 中 Tg 活性的必需氨基酸残基, D50 和 R156 是参与该酶切除 DNA 中的 Tg。

基于 Tko-EndoIII 突变分析的结果和我们实验室的研究结果, 可以总结出极端嗜热古菌 EndoIII 保守的氨基酸残基功能如下: K133 (K140) 和 D151 (D158) 负责 DNA 糖苷酶活性, H153 (H160) 识别 Tg 和参与结合 DNA, S45 (S57) 和 D50 (D62): AP 裂合酶活性



K133 (K140) and D151 (D158): glycosylase activity
H153 (H160): Tg recognition and DNA interaction
S45 (S57) and D50 (D62): AP lyase activity
G129 (G136), C201 (C208) and C208 (C215): DNA interaction

图 4 Sis-EndoIII 的同源建模结构

Figure 4 Homologous structural model of Sis-EndoIII. HhH-GPD motif and Fe-S cluster loop are colored with cyan and pink, respectively. Amino acid residues are shown with sticks, among which amino acid residues in Tko-EndoIII are shown in parentheses.

和 D50 (D62) 负责 AP 裂合酶活性, G129 (G136)、C201 (C208) 和 C208 (C215) 参与结合 DNA (图 4)。

4 总结和展望

EndoIII 广泛存在于细菌、古菌和真核生物中, 该酶含有保守的 HhH 结构域和 FCL, 具有偶联的 DNA 糖苷酶和 AP-裂合酶 2 种活性, 能够切除 DNA 中的 Tg 及其他修饰的嘧啶碱基。与其他来源的 EndoIII 不同, 极端嗜热古菌 EndoIII 能够在高温条件下切除 DNA 中的 Tg, 从而避免基因组中 Tg 的积累。另外, 极端嗜热古菌 EndoIII 比其他 EndoIII 具有更强的耐热性。

目前, 极端嗜热古菌 EndoIII 与含有 Tg 的 DNA 形成复合物的晶体结构尚未得到解析。对极端嗜热古菌 EndoIII 与 DNA 形成复合物晶体结构的解析, 并通过构建突变体, 进一步探讨其催化机理以及研究其耐热机制和在高温条件下切除 DNA 中 Tg 的分子机制, 从而阐明其结构与功能的关系, 都是值得深入研究的方向。

尽管体外研究已经证实了极端嗜热古菌 EndoIII 能够切除 DNA 中的 Tg, 暗示着其在修复 DNA 中损伤碱基 Tg 中扮演着重要角色, 但是它是否在细胞内参与修复基因组 DNA 中的 Tg, 目前尚不清楚。以遗传操作系统比较完善的极端嗜热古菌为研究对象, 比如 *S. islandicus* REY15A 和 *T. kodakarensis*, 敲除编码 EndoIII 的基因, 构建相应的突变菌株, 然后以野生型菌株为对照, 在存在氧化剂条件下测试突变体菌株的生长情况、细胞形态等, 从而揭示极端嗜热古菌 EndoIII 细胞内的功能, 是今后研究的重要方向之一。

目前, 对于极端嗜热古菌 EndoIII 切除 DNA 中的 Tg 所产生切口的修复尚未有报道。极端嗜

热古菌 EndoIII 如何与细胞内的一些蛋白或酶相互作用, 并完成该酶作用于 DNA 后的后续修复, 也是亟待探讨的问题。

参考文献

- [1] Jean C, Richard WJ. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(2): a012559.
- [2] Dolinnaya NG, Kubareva EA, Romanova EA, Trikin RM, Oretskaya TS. Thymidine glycol: the effect on DNA molecular structure and enzymatic processing. *Biochimie*, 2013, 95(2): 134–147.
- [3] Cathcart R, Schwiers E, Saul RL, Ames BN. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *PNAS*, 1984, 81(18): 5633–5637.
- [4] Pierre A, Rould MA, Matthew H, Wallace SS, Sylvie D. A structural rationale for stalling of a replicative DNA polymerase at the most common oxidative thymine lesion, thymine glycol. *PNAS*, 2007, 104(3): 814–818.
- [5] Tornaletti S, Maeda LS, Lloyd DR, Reines D, Hanawalt PC. Effect of thymine glycol on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(48): 45367–45371.
- [6] Romano CA, Sontz PA, Barton JK. Mutants of the base excision repair glycosylase, endonuclease III: DNA charge transport as a first step in lesion detection. *Biochemistry*, 2011, 50(27): 6133–6145.
- [7] Radman M. An endonuclease from *Escherichia coli* that introduces single polynucleotide chain scissions in ultraviolet-irradiated DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 1976, 251(5): 1438–1445.
- [8] Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S. Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 2002, 32(45): 12105–12111.
- [9] Dizdaroglu M, Bauche C, Rodriguez H, Laval J. Novel substrates of *Escherichia coli* nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. *Biochemistry*, 2000, 39(18): 5586–5592.
- [10] Yang Y, Park SH, Alford-Zappala M, Lee HW, Li J, Cunningham RP, Cao WG. Role of endonuclease III enzymes in uracil repair. *Mutation Research*, 2019, 813: 20–30.
- [11] Dai L, Xia J, Sahin O, Zhang QJ. Identification of a *nth*-like gene encoding an endonuclease III in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 698.
- [12] Aspinwall R, Rothwell DG, Roldan-Arjona T, Anselmino C, Ward CJ, Cheadle JP, Sampson JR, Lindahl T, Harris PC, Hickson ID. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. *PNAS*, 1997, 94(1): 109–114.
- [13] Ikeda S, Biswas T, Roy R, Izumi T, Boldogh I, Kurosky A, Sarker AH, Seki S, Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(34): 21585–21593.
- [14] Eide L, Luna L, Gustad EC, Henderson PT, Essigmann JM, Demple B, Seeberg E. Human endonuclease III acts preferentially on DNA damage opposite guanine residues in DNA. *Biochemistry*, 2001, 40(22): 6653–6659.
- [15] You HJ, Swanson RL, Doetsch PW. *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry*, 1998, 37(17): 6033–6040.
- [16] Alseth I, Eide L, Pirovano M, Rognes T, Seeberg E, Bjørås M. The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(5): 3779–3787.
- [17] Sarker AH, Ikeda S, Nakano H, Terato H, Ide H, Imai K, Akiyama K, Tsutsui K, Bo Z, Kubo K, Yamamoto K, Yasui A, Yoshida MC, Seki S. Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 282(4): 761–774.
- [18] Zatopek KM, Gardner AF, Kelman Z. Archaeal DNA replication and repair: new genetic, biophysical and molecular tools for discovering and characterizing enzymes, pathways and mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(4): 477–488.
- [19] Trasviña-Arenas CH, Demir M, Lin WJ, David SS. Structure, function and evolution of the helix-hairpin-

- helix DNA glycosylase superfamily: piecing together the evolutionary puzzle of DNA base damage repair mechanisms. *DNA Repair*, 2021, 108: 103231.
- [20] Kanchan S, Mehrotra R, Chowdhury S. *In silico* analysis of the endonuclease III protein family identifies key residues and processes during evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 2015, 81(1/2): 54–67.
- [21] Thayer MM, Ahern H, Xing D, Cunningham RP, Tainer JA. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO Journal*, 1995, 14(16): 4108–4120.
- [22] Fromme JC, Verdine GL. Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate. *The EMBO Journal*, 2003, 22(13): 3461–3471.
- [23] Sarre A, Ökvist M, Klar T, Hall DR, Smalås AO, McSweeney S, Timmins J, Moe EL. Structural and functional characterization of two unusual endonuclease III enzymes from *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Structural Biology*, 2015, 191(2): 87–99.
- [24] Liu X, Roy R. Mutation at active site lysine 212 to arginine uncouples the glycosylase activity from the lyase activity of human endonuclease III. *Biochemistry*, 2001, 40(45): 13617–13622.
- [25] Moe EL, Rollo F, Silveira CM, Sezer M, Hildebrandt P, Todorovic S. Spectroelectrochemical insights into structural and redox properties of immobilized endonuclease III and its catalytically inactive mutant. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 188: 149–154.
- [26] Fu W, O’Handley S, Cunningham RP, Johnson MK. The role of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* endonuclease III. A resonance Raman study. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(23): 16135–16137.
- [27] Boal AK, Yavin E, Lukianova OA, O’Shea VL, David SS, Barton JK. DNA-bound redox activity of DNA repair glycosylases containing [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry*, 2005, 44(23): 8397–8407.
- [28] Kuo CF, McRee DE, Fisher CL, O’Handley SF, Cunningham RP, Tainer JA. Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. *Science*, 1992, 258(5081): 434–440.
- [29] Ekanger LA, Oyala PH, Moradian A, Sweredoski MJ, Barton JK. Nitric oxide modulates endonuclease III redox activity by a 800 mV negative shift upon [Fe₄S₄] cluster nitrosylation. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(37): 11800–11810.
- [30] Moe EL, Sezer M, Hildebrandt P, Todorovic S. Surface enhanced vibrational spectroscopic evidence for an alternative DNA-independent redox activation of endonuclease III. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2015, 51(15): 3255–3257.
- [31] Sarre A, Stelter M, Rollo F, De Bonis S, Seck A, Hognon C, Ravanat JL, Monari A, Dehez F, Moe EL, Timmins J. The three endonuclease III variants of *Deinococcus radiodurans* possess distinct and complementary DNA repair activities. *DNA Repair*, 2019, 78: 45–59.
- [32] Watanabe T, Blaisdell JO, Wallace SS, Bond JP. Engineering functional changes in *Escherichia coli* endonuclease III based on phylogenetic and structural analyses. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(40): 34378–34384.
- [33] Nelson SR, Dunn AR, Kathe SD, Warshaw DM, Wallace SS. Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases. *PNAS*, 2014, 111(20): E2091–E2099.
- [34] Kuznetsov NA, Kladova OA, Kuznetsova AA, Ishchenko AA, Saparbaev MK, Zharkov DO, Fedorova OS. Conformational dynamics of DNA repair by *Escherichia coli* endonuclease III. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(23): 14338–14349.
- [35] Birkeland NK, Schönheit P, Poghosyan L, Fiebig A, Klenk HP. Complete genome sequence analysis of *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324 (DSM 8774), a hyperthermophilic archaeal sulfate reducer from a North Sea oil field. *Standards in Genomic Sciences*, 2017, 12: 79.
- [36] Shekhtman A, McNaughton L, Cunningham RP, Baxter SM. Identification of the *Archaeoglobus fulgidus* endonuclease III DNA interaction surface using heteronuclear NMR methods. *Structure*, 1999, 7(8): 919–930.
- [37] Yang H, Phan IT, Fitz-Gibbon S, Shivji MK, Wood RD, Clendenin WM, Hyman EC, Miller JH. A thermostable endonuclease III homolog from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(3): 604–613.
- [38] Yvan Z, Jean A, Arnaud L, Christophe L, Philippe G, Murielle D, Véronique A, Patrick F, Patrick W, Fabrice C. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the archaea. *Genome Biology*, 2009, 10(6): R70.
- [39] Barbier E, Lagorce A, Hachemi A, Dutertre M, Gorlas

- A, Morand L, Saint-Pierre C, Ravanat JL, Douki T, Armengaud J, Gasparutto D, Confalonieri F, Breton J. Oxidative DNA damage and repair in the radioresistant archaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29(11): 1796–1809.
- [40] Atomi H, Reeve J. Microbe profile: *Thermococcus kodakarensis*: the model hyperthermophilic archaeon. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(11): 1166–1168.
- [41] Shiraishi M, Mizutani K, Yamamoto J, Iwai S. Mutational analysis of *Thermococcus kodakarensis* endonuclease III reveals the roles of evolutionarily conserved residues. *DNA Repair*, 2020, 90: 102859.
- [42] Back JH, Chung JH, Park YI, Kim KS, Han YS. Endonuclease IV enhances base excision repair of endonuclease III from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *DNA Repair*, 2003, 2(5): 455–470.
- [43] Katafuchi A, Nakano T, Masaoka A, Terato H, Iwai S, Hanaoka F, Ide H. Differential specificity of human and *Escherichia coli* endonuclease III and VIII homologues for oxidative base lesions. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(14): 14464–14471.
- [44] Asagoshi K, Odawara H, Nakano H, Miyano T, Terato H, Ohya Y, Seki S, Ide H. Comparison of substrate specificities of *Escherichia coli* endonuclease III and its mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates. *Biochemistry*, 2000, 39(37): 11389–11398.
- [45] Zhang CY, Krause DJ, Whitaker RJ. *Sulfolobus islandicus*: a model system for evolutionary genomics. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(1): 458–462.
- [46] Peng N, Han WY, Li YJ, Liang YX, She QX. Genetic technologies for extremely thermophilic microorganisms of *Sulfolobus*, the only genetically tractable genus of *Crenarchaea*. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(4): 370–385.
- [47] Zhang L, Wang L, Wu L, Jiang D, Tang C, Wu Y, Wu M, Chen M. Biochemical characterization and mutational studies of a thermostable endonuclease III from *Sulfolobus islandicus* REY15A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193(Pt A): 856–865.

(本文责编 李磊)