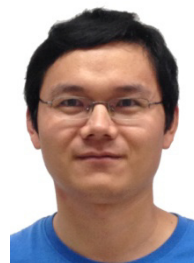


哺乳动物 DNA 连接酶在 DNA 双链断裂修复通路中的作用

芦广庆^{1,2}, 段金志^{1,2}, 张昱^{1,2}

1. 北京生命科学研究所, 北京 102206;

2. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730



芦广庆(博士研究生)



段金志(博士研究生)

保持基因组的完整性和稳定性对于生物体的存活是十分重要的。DNA 损伤来源于多方面, 主要包括内源性的生理因素(如细胞代谢产物、DNA 复制错误、抗体类别转换等)和外源性因素(如 UV 照射、同位素辐射等)。基因组 DNA 一旦发生损伤, 机体内的 DNA 损伤修复机制就会被激活。DNA 被错误地修复会导致基因突变或者基因组的不稳定, 包括染色体缺失、扩增以及转位, 最终这些突变的细胞可能会转化为癌细胞, 进而引起肿瘤的发生。

DNA 双链断裂(DNA double-strand break, DSB)被认为是最为严重的一种 DNA 损伤。哺乳动物细胞中 DNA 双链断裂的修复方式主要有两种: 同源重组(Homologous recombination, HR)和非同源的末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)。HR 发生在细胞周期的 S 期和 G₂ 期, 依赖于姐妹染色单体的同源序列为模版进行修复。NHEJ 可以发生在细胞周期的各个时期, 不依赖于同源序列, 而是直接连接两个 DNA 断裂末端, 因此 NHEJ 往往会导致 DNA 连接处的缺失、插入和突变。尤为重要的是, NHEJ 能够连接两个距离比较远的 DNA 双链断裂末端, 这两个 DNA 双链断裂末端可以是位于同一条染色体, 也可以是位于不同的染色体。因此, NHEJ 也能造成染色体缺失和转位, 这与基因组的进化和癌症发生密切相关。

经典的 NHEJ 修复方式在过去的数十年被大量详细研究, 其修复机制也比较清楚, 大致可以分为以下几步: 首先, DNA 双链断裂的末端被识别后, Ku70 和 Ku80 以异二聚体的形式结合到 DNA 双链断裂的末端; 然后募集一些 DNA 核酸酶和聚合酶, 依靠其酶活性加工 DNA 末端为最后的连接做准备;

最后由 DNA 连接酶 IV 和 XRCC4 的复合物催化连接, 完成修复。

V(D)J 重组和抗体类型转换(Class switch recombination, CSR)是研究 NHEJ 十分重要的体内模型。在 V(D)J 重组过程中, DNA 双链断裂是由 RAG1 和 RAG2 两个内切酶催化产生的。在 NHEJ 缺陷的小鼠(如 DNA 连接酶 IV 或者 XRCC4 缺失)体内, V(D)J 重组完全不能发生, 因此这些小鼠没有成熟的小鼠 B 细胞和 T 细胞。当与 p53 缺陷的小鼠杂交后, 这些 RAG 造成的 DNA 双链断裂会导致严重的基因组不稳定, 特别是一些染色体转位, 从而导致这些小鼠体内产生致命的白血病或者淋巴瘤。在这种 NHEJ 缺陷的小鼠细胞内, 染色体转位仍然可以发生, 表明还存在着一种非经典的非同源末端连接(Alternative end joining, A-EJ)修复方式。哺乳动物的 B 细胞可以改变免疫球蛋白的非可变区, 使抗体类型发生变化, 这个过程被称为 CSR。CSR 常常被用来研究 NHEJ 和 A-EJ。激活诱导胞嘧啶脱氨酶(AID)可以在免疫球蛋白重链的不同抗体转换区域诱导产生大量的 DNA 双链断裂, 这些 DNA 双链断裂被 NHEJ 修复。当 NHEJ 的核心修复蛋白, 如 DNA 连接酶 IV、XRCC4 或者 Ku70 和 Ku80 的二聚体缺失时, CSR 通过 A-EJ 的活性来完成。毫无疑问的是, 在经典 NHEJ 缺陷的情况下, A-EJ 催化所有的末端连接; 然而, 当经典 NHEJ 存在时, A-EJ 是不是同样发生作用却不清楚。同时, 最近的研究发现 A-EJ 催化小鼠细胞内的染色体转位, 但在人类细胞中的贡献却很少。

虽然在多种真核细胞及体内生理过程中都发现

了不同程度的 A-EJ 活性,然而迄今为止对于直接参与 A-EJ 的关键蛋白及其作用机制却仍然不是很清楚,甚至对目前已知的一些可能参与 A-EJ 修复的因子大多都存在争议。因此,系统探究参与 A-EJ 的因子具有重要的意义。

本研究团队从 DSB 修复的最后一步入手,寻找介导 A-EJ 修复的 DNA 连接酶,为进一步寻找 A-EJ 修复通路中的其他因子奠定基础。在哺乳动物中,已知的 DNA 连接酶只有 DNA 连接酶 I、III 和 IV。研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统,成功地在缺失了经典非同源修复的核心因子 DNA 连接酶 IV 的小鼠 B 细胞系中进一步敲除了细胞核内的 DNA 连接酶 I 或 III。研究人员惊奇地发现,DNA 连接酶 I 或 III 缺失没有影响 A-EJ 介导的大部分类型的 DSB 修复,包括细胞因子介导的 CSR、CRISPR/Cas9/sgRNA 介

导的 CSR 以及 CRISPR/Cas9/sgRNA 介导的不同长度染色体的删除缺失。然而,对于 A-EJ 介导的染色体转位这种 DSB 的特殊修复方式,DNA 连接酶 I 和 III 表现了显著的功能特异性。DNA 连接酶 III 和 IV 双缺陷的细胞与单独 DNA 连接酶 IV 缺陷的细胞相比,染色体间的转位效率明显下降。同时,染色体转位连接处的序列分析显示,DNA 连接酶 III 缺失导致染色体转位连接处有更长的微同源序列 (Microhomology)。这项研究表明,在 A-EJ 介导的 DSB 修复过程中,DNA 连接酶 I 和 III 既有功能上的相互可替代性,也有其功能特异性。这项研究为哺乳动物细胞中存在不同的 DNA 连接酶修复复合物介导 A-EJ 提供了证据。该研究结果于 2016 年 1 月 19 日在线发表于 *Proc Natl Acad Sci USA* (DOI: 10.1073/pnas.1521597113)。

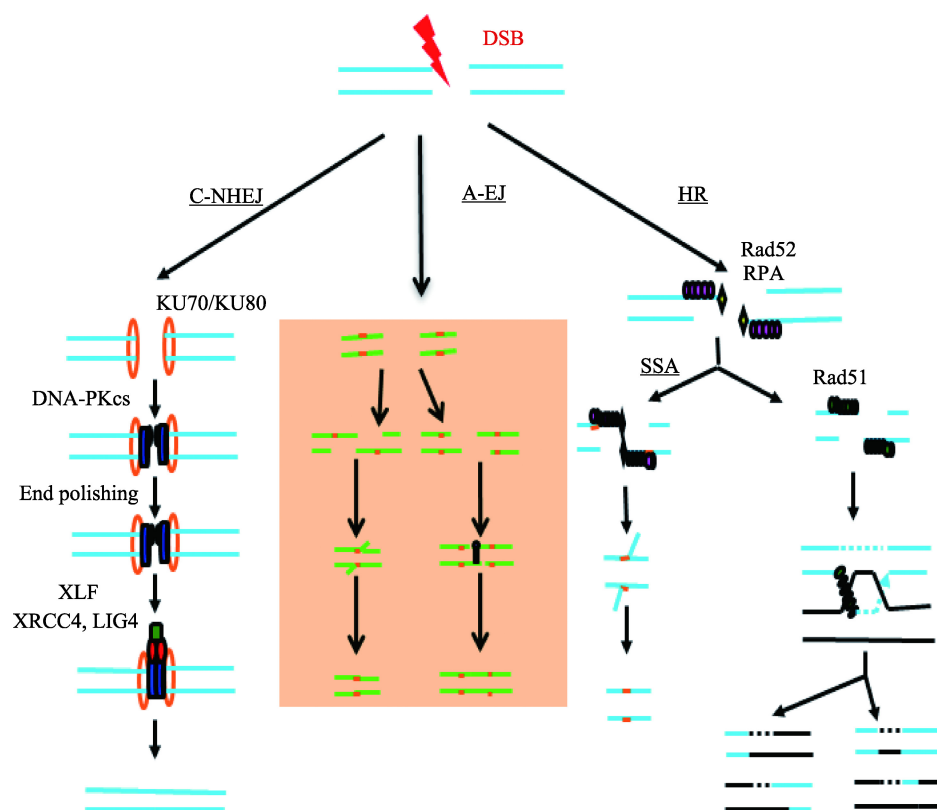


图 1 哺乳动物 DNA 双链断裂修复方式

Fig. 1 DNA double strand break repair pathways in mammals

哺乳动物中存在 3 种 DNA 双链断裂修复方式: 同源重组 (HR), 经典非同源末端连接 (C-NHEJ) 和非经典末端连接 (A-EJ)。