论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201407175

DNA-PKcs在DNA双链断裂应答过程中对H2AX磷酸化起主导作用

李 明[1],罗鑫荣[2,3],厉红元[2,3],程 巧[2,3] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:肝胆外科[1],内分泌乳腺外科[2],肿瘤分子生物及表观遗传学实验室[3])

[摘要] **目的** 研究在DNA双链断裂(double strand break, DSB)情况下,DNA-PKcs和ATM在磷酸化H2AX中所发挥的作用。**方法** 在HeLa细胞中,以高效的DNA双链断裂诱导剂新制癌菌素(neocarzinostatin, Ncs)诱导DSB形成, Western blot分析H2AX磷酸化的时间,剂量依赖及其去磷酸化的动态变化。DNA-PKcs抑制剂NU7026及ATM抑制剂Ku55933分别作用细胞,Western blot检测其对H2AX磷酸化的影响。以α-satellite序列为对象,γ-H2AX CHIP检测DNA-PKcs或ATM抑制前后H2AX磷酸化情况,得出定量数据。**结果** γ-H2AX生成呈Ncs作用时间及剂量依赖过程。Ncs短时间作用后,γ-H2AX能够去磷酸化恢复。抑制DNA-PKcs明显影响γ-H2AX生成,而抑制ATM使得γ-H2AX生成高峰延迟。CHIP显示抑制DNA-PKcs后其DNA富集倍数仅为抑制前的27%,而抑制ATM后其富集倍数为抑制前的63%。**结论** DNA-PKcs可能在DNA双链断裂应答过程中对H2AX磷酸化起主导作用。

[关键词] DNA双链断裂; H2AX磷酸化; DNA-PKcs

[中图法分类号] R394-33; R394.3 [文献标志码] A

DNA-PKcs predominates in phosphorylation of H2AX in response to double-strand break *in vitro*

Li Ming[1], Luo Xingrong[2,3], Li Hongyuan[2,3], Cheng Qiao[2,3] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [2]Department of Endocrinology and Breast Surgery, [3]Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To elucidate the roles of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs and Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), playing in the phosphorylation of H2AX in response to DNA double strand breaks (DSB). Methods In HeLa cells, DSBs were induced with neocarzinostatin (Nsc), a high efficient inducer of DNA DSB. The time course, dose response of phosphorylation of H2AX and the kinetics of dephosphorylation of γ-H2AX were analyzed by Western blotting. The effects of DNA-PKcs inhibitor NU7026 and ATM inhibitor Ku55933 on the phosphorylation of H2AX were also detected by Western blotting. Chromatin immunoprecipitation (CHIP) was applied to detect the enrichment of γ-H2AX on the damaged DNA within α-satellite sequences. Results Nsc resulted in increased phosphorylation of H2AX in a time- and dose-dependent manner. γ-H2AX was dephosphorylated after Ncs treatment for short time. The phosphorylation of H2AX was significantly inhibited by DNA-PKcs inhibition. The inhibition of ATM delayed the phosphorylation of H2AX. The enrichment of γ-H2AX after DNA-PKcs inhibition was only 27% of that when DNA-PKcs functioned properly. CHIP indicated that the number of enrichedγ-H2AX was 63% after ATM inhibition. Conclusion DNA-PKcs is the predominant kinase involved in the phosphorylation of H2AX in response to DSB.

[**Key words**] DNA double strand break; H2AX phosphorylation; DNA-PKcs

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81101653) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10037). Corresponding author: Cheng Qiao, E-mail: c914chengqiao@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81101653);重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10037)

[通信作者] 程 巧,E-mail: c914chengqiao@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1529.061.html(2014-12-02)

DNA 双链断裂(double-strand break,DSB)是诸多 DNA 损伤类型中对基因组的完整、稳定性影响最大的一种损伤形式,众多内源性及外源性因素,如:活性氧自由基、V(D)J 重组、离子射线及某些 DNA 损伤试剂均能诱导其产生;其修复过程的关键早期应答是组蛋白 H2AX 的磷酸化(γ-H2AX),该蛋白由 H2AX 基因编码,其 C 端 Ser139 位点是 PIKKs 家族的磷酸化识别位点,能够被所有的 3 个 PIKKs 家族成员(包括 DNA-PK、ATM 和 ATR)磷酸化[1],并在 DSB 位点附近延伸 0.5 ~ 2 Mbp 范围。γ-H2AX 在 DSB 损伤信号传导过程中扮演极其重要的角色,包括募集下游因子启动 DNA 修复、细胞周期检查点以及诱导凋亡等后续反应[1-2]。

DNA-PKcs(DNA 依赖的蛋白激酶催化亚单位)是 DSB 修复途径 NHEJ(非同源末端连接)的关键因子,与 Ku70/80 二聚体一起,构成 DNA 依赖的蛋白激酶,募集其他修复相关蛋白到损伤位点。与同属 PIKKs 家族的 ATM 和 ATR 不同,它在 DNA 损伤信号传导途径中几乎不发挥作用,因此在 DNA-PKcs 缺陷细胞中,细胞周期检查点阻滞表现正常[3]。ATM 由 DSB 激活,是 DSB 应答反应信号传导的重要组成,其磷酸化底物广泛,包括 Chk1/2、Rad17、BRCA1、BLM、53BP1、MDC1 等。ATR 的功能及作用底物与 ATM 相似,在应对复制刺激,单链断裂和 UV 损伤时,H2AX 主要由 ATR 进行磷酸化[4]; H2AX 的磷酸化作用机制存在争议,长期以来,ATM 被认为在磷酸化 H2AX 中占主导作用,或认为 H2AX 由 DNA-PK 和 ATM 共同作用进行磷酸化[3]。近年报道发现 DNA-PKcs 在磷酸化 H2AX 中发挥越来越重要的作用[5],本研究通过 Ncs 诱导 DSB,Western blot 检测 γ-H2AX 生成的时间和剂量依赖过程,及其去磷酸化的恢复过程,检测 PIKK 抑制剂对其生成的影响,并首次通过染色质免疫共沉淀(CHIP)检测,在 PIKK 抑制剂作用前后 H2AX 在中心粒 DNA 重复序列-α-satellite 的磷酸化情况的变化,得出量化数据,为阐明 H2AX 磷酸化关键酶提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

Anti-H2AX、anti-pS2056 兔抗人多克隆抗体(Abcam 公司),anti-αtubulin(Santa Cruz 公司),anti-pT2609(bioLegend 公司),山羊抗小鼠和抗兔辣根过氧化物酶标记二抗(Jackson Lab 公司),DSB 诱导剂 neocazinostartin (Ncs, Sigma 公司)。ATM 抑制剂 Ku55933 和 DNA-PKcs 抑制剂 Nu7026(Selleck 公司)。CHIP 试剂盒、SsoFast Evagreen supermix(Bio-Rad 公司),α-satellite 引物由 Sigma 合成:上游 5′-TCATTC-CCACAAACTGCGTTG-3′,下游:5′-TCCAACGAAGGC-CACAAGA-3′,片段大小:136 bp。其他常用试剂及人宫颈腺癌 HeLa 细胞株由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 DSB 诱导时间剂量依赖及细胞恢复测试 培养 HeLa 细胞于 DMEM 培养液,添加 10% 胎牛血清及 125 U 青霉素和 125 μg /mL 链霉素, 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。以 0、0.05、0.1、0.5、1 μmol/L neocarzinostatin(Ncs)作用 1 h 或以 0.5 μmol/L Ncs 作用细胞 0、5、15、30 min 或 1 h。细胞恢复测试:取 0.5 μmol/L Ncs,处理细胞 30 min 或 1 h 后,立即更换培养液,再继续培养 0、1、2、4 h,并设置未处理对照。冰上收集细胞,行 Western blot 检测。

1.2.2 DNA-PKcs 及 ATM 抑制实验 0、20、40、80 μmol/L DNA-PKcs 抑制剂 NU7026 或 ATM 抑制剂 Ku55933 预处理细胞 2 h,后以 0.5 μmol/L Ncs 作用细胞 30 min,换液,细胞恢复 0、1、2 h,并设置未处理对照。冰上收集细胞,行 Western blot 检测。

1.2.3 染色质免疫共沉淀(CHIP) 使用 Bio-Rad CHIP 试剂盒。细胞处理后,以 1% 甲醛作用 10 min 交联。0.125 mol/L 甘氨酸作用 5 min 以中和。冷 PBS 洗 2 次,将细胞刮下,离心收集,置于冰上。顺序提取细胞质及细胞核,将细胞核提取液在冰上进行以超声处理,使染色质切断至 100 ~ 600 bp,11 000 × *g* 离心 5 min,收集上清液。将该染色质溶液以 CHIP 稀释液稀释 10 倍,后以琼脂糖珠作预清除(Bio-Rad, CHIP grade agarose beads), 2 mL 染色质稀释溶液 + 40 μL 琼脂糖珠,4 ℃条件下,旋转孵育 2 h。3 000 × *g* 离心 5 min,收集上清液。取 50 μg 染色质/CHIP, 加入 γ-H2AX 单抗,兔 IgG 用作阴性对照。CHIP 反应在 4 ℃下摇摆孵育过夜。琼脂糖珠偶联反应, 清洗, 洗脱, 逆转交联及纯化 DNA 参照试剂盒推荐步骤。

1.2.4 CHIP-Real-timePCR 及数据分析 测定免疫沉淀的 DNA, 选用 SsoFast EvaGreen Supermix(Bio-Rad 公司), 其中包含 Sso7d-fusion polymerase, dNTP, EvaGreen 染料等。免疫沉淀的待测 DNA 上样量为 2 μL,每样本 2 次重复。靶序列引物 α-satellite 见 1.1。反应条件:预变性 98 ℃ 3 min,变性 98 ℃ 10 s,退火延伸 58 ℃ 30 s,36 个循环。所得样本数据以本组 input 为参照进行标准化得出富集量,所有富集量均以本组 IgG 阴性对照相比得出相对富集倍数。实验均重复 3 次。

1.3 统计学方法

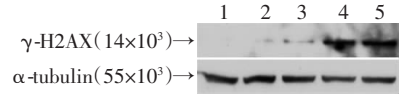
采用 SPSS 17.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行成组 t 检验。

2 结果

2.1 H2AX 磷酸化对 DSB 诱导剂的剂量时间依赖和恢复过程

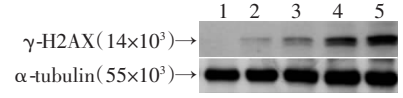
随着 Ncs 作用浓度的增加,γ-H2AX 的生成逐渐

增多(图1)。随后,对 Ncs 作用不同时间后的细胞总蛋白提取物的检测发现,随着 Ncs 作用时间的增加,γ-H2AX 的生成逐渐增多(图2)。以0.5 μmol/L Ncs 作用 30 min 或 1 h 后进行恢复过程的检测,发现 0.5 μmol/L Ncs 作用 30 min 的细胞恢复 1 h 后,γ-H2AX 的生成达到最高水平,随后逐渐下降。然而在作用1 h 的情况下,γ-H2AX 在达峰后不能去磷酸化恢复(图3)。



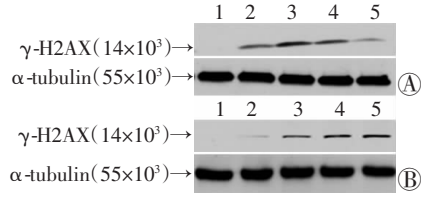
1~5:Ncs 处理剂量分别为 0、0.05、0.1、0.5、1 μmol/L

图1 γ-H2AX 对 Ncs 的剂量依赖过程



1~5:Ncs 处理时间分别为 0、5、15、30、60 min

图2 γ-H2AX 对 Ncs 的时间依赖过程

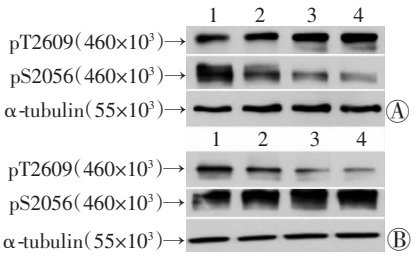


A:0.5 μmol/L Ncs 处理 30 min 后恢复;B:0.5 μmol/L Ncs 处理 1 h 后恢复 1:未处理对照;2~5:0、1、2、4 h

图3 γ-H2AX 脱磷酸化恢复过程

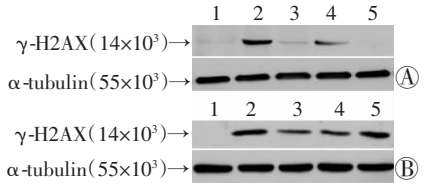
2.2 DNA-Pkcs 及 ATM 抑制剂对 H2AX 磷酸化的影响

随着 NU7026 或 Ku55933 浓度的上升(0、20、40、80 μmol/L),DNA-PKcs 磷酸化位点 S2056 和 T2609 的可检测信号逐渐降低。但 NU7026 并不影响 T2609 的磷酸化,Ku55933 也不影响 S2056 的磷酸化(图4)。在 NU7026 或 Ku55933 处理后,γ-H2AX 的生成均明显下降,在 NU7026 作用组呈持续下降趋势,而在 Ku55933 处理组,γ-H2AX 的生成高峰延迟到细胞恢复 2 h 后(图5)。



A:不同浓度 NU7026 预处理 2 h;B:不同浓度 Ku55933 预处理 2 h 1~4 分别为 0、20、40、80 μmol/L

图4 NU7026 及 Ku55933 对 DNA-Pkcs 磷酸化的抑制



A:0.5 μmol/L Ncs + 80 μmol/L NU7026;B:0.5 μmol/L Ncs + 80 μmol/L Ku55933 1:未处理对照;2:Ncs 处理后 1 h;3:抑制剂 + Ncs 处理后 1 h;4:Ncs 处理后 2 h;5:抑制剂 + Ncs 处理后 2 h

图5 NU7026 及 Ku55933 对 H2AX 磷酸化的影响

2.3 γ-H2AX 染色质免疫共沉淀

在无损伤情况下,γ-H2AX 相对富集量为 1.12 倍。而在 Ncs 作用后,γ-H2AX 相对富集量为 4.76 倍,NU7026 处理组为 1.31 倍,仅为 NU7026 未处理组富集量的 27%($P<0.05$)。在另一组独立实验中,Ncs 作用后,γ-H2AX 相对富集量是 4.5 倍,KU55933 处理组为 2.82 倍,为 KU55933 未处理组富集量的 63%($P<0.05$)。

3 讨论

DSB 是对基因组完整性影响最大的一种 DNA 损伤形式,或导致细胞死亡,或导致基因变异,癌症发生。为了应对 DSB,细胞内数以百计的 DNA 损伤反应蛋白被有组织、有顺序的募集到损伤部位,参与信号传导,启动修复途径,或启动细胞周期阻滞乃至诱导细胞凋亡。在所有损伤应答的早期事件中,组蛋白 H2AX 的 Ser139 位点迅速磷酸化(γ-H2AX)是信号传导的关键环节,H2AX 缺陷小鼠细胞表现出强烈的基因组不稳定并且 DNA 修复蛋白募集障碍[6]。尽管对于 H2AX 的磷酸化机制已经有了大量研究,但近年来,H2AX 的磷酸化是由 ATM 单独完成或由 ATM 和 DNA-PKcs 共同完成却成为一个有争议的观点。有报道称 DNA-PKcs 在 H2AX 磷酸化过程中占主导地位[5];在脾细胞中,γ-H2AX 的生成主要受 DNA-PK 的调控[7]。我们的研究采用 γ-H2AX 染色质免疫共沉淀的方法,为这一有争议的观点补充定量数据。

neocarzinostatin 是由载体蛋白及发色基团构成的高效的蛋白质抗生素家族 DSB 诱导剂,在 nmol 级别便发挥活性,100 ng/mL(约 10 nmol/L)浓度作用下便可观察到 DNA 修复蛋白染色质聚集的荧光信号[8]。并且在孵育数分钟内便可诱导 DSB 生成[9]。这与本文中 Ncs 处理后 5 min 内诱导 γ-H2AX 生成相符。为进一步观察 Ncs 的作用是否具有浓度及时间依赖性,我们进行了浓度梯度(0、0.05、0.1、0.5、1 μmol/L)及时间过程实验(0、5、15、30 min 及 1 h),结果显示 Ncs 作用细胞,诱导 H2AX 磷酸化呈现出浓度及时间依赖,提示要得到更多的 γ-H2AX,需要采用较长的作用时

间和较大的作用浓度。Ncs 作用后 1 h 内 γ-H2AX 达到峰值,这可能因其在损伤染色质周围延伸所致[10];随后缓慢去磷酸化,4 h 后明显降低,但这取决于损伤的程度,即与 Ncs 的作用时间及作用浓度有关。在本研究中,大于 1 h 的作用时间后,γ-H2AX 不能去磷酸化,这可能是因为过度的损伤超出细胞的修复能力,乃至细胞凋亡所致。因此,本研究最终选择 0.5 μmol/L 的 Ncs 作用 30 min,细胞恢复 1 h 的状态来完成研究。

在 HeLa 细胞中,干扰 DNA-PKcs 表达会同时引起 ATM 的下调[11]。因此我们仅仅采用 DNA-PKcs 抑制剂而非其表达干扰的方式来进行研究。当 DSB 发生后,DNA-PKcs 在其 S2056 位点发生自磷酸化,而其 T2609 位点被 ATM 磷酸化。采用 DNA-PKcs 特异性抑制剂 NU7026,通过 0 ~ 80 μmol/L 的浓度梯度作用,DNA-PKcs 自磷酸化位点 S2056 的磷酸化形式逐渐下降,然而 T2609 位点的磷酸化却不受影响。相应地,ATM 的特异性抑制剂 Ku55933 处理后,T2609 位点的磷酸化形式逐渐下降,而 S2056 的磷酸化不受影响。因此,选用 80 μmol/L 的作用浓度,可以有效的、特异的抑制 DNA-PKcs 或 ATM。我们通过免疫印迹发现,NU7026 明显抑制 Ncs 诱导的 γ-H2AX 生成。虽然 KU55933 也抑制 γ-H2AX 生成,但 1 h 以后 γ-H2AX 生成恢复,呈高峰延后的状况。这与有报道在 ATM 缺陷 MEF 细胞,2 Gay X 射线诱导的 γ-H2AX 高峰出现延迟相似[3],可能因为 ATM 在 DSB 早期应答作用更为重要有关。至此,我们仍难以得出 DNA-PKcs 或 ATM 对磷酸化 H2AX 中谁起主导作用。因此,我们选用 γ-H2AX 染色质免疫共沉淀(CHIP)对 H2AX 在 DSB 的磷酸化状况进行分析。不同于限制性内切酶的作用,Ncs 等化学诱导剂及射线所产生的 DSB 是随机的,因此在进行定位性研究时,我们必须选用 DNA 重复序列以增加探测到 DSB 的概率。α-satellite 是 171 bp 的中心粒序列,每个染色体包含多种 α-satellite 序列,不断重复并可延伸至 5 Mbp 长度,因此我们以此为靶目标来进行 γ-H2AX CHIP 研究。在未处理对照组,γ-H2AX 富集量很低,与非特异性阴性对照 IgG 相当,即相对富集量接近于 1。Ncs 作用后,γ-H2AX 相对富集量为 4.76 倍,同时施加 NU7026 处理后,γ-H2AX相对富集量仅为 1.31 倍,为 NU7026 未处理组富集量的 27%($P < 0.05$),因此抑制 DNA-PKcs 后,γ-H2AX 生成受抑 73%,说明 DNA-PKcs 在磷酸化 H2AX 过程中发挥主导作用。为进一步证明我们的结论,我们进行了 ATM 抑制实验,Ncs 作用后,γ-H2AX 相对富集量为 4.5 倍,接近于之前的 4.76 倍。KU55933 处理组为 2.82 倍,为 KU55933 未处理组的 63%($P < 0.05$),因此抑制 ATM 后,γ-H2AX 生成受抑仅 37%,远远低于抑制 DNA-PKcs 所带来的影响。

综上所述,本研究结果提示在 DSB 应答过程中,DNA-PKcs 对 H2AX 磷酸化起主导作用。进一步显示出 DNA-PKcs 在 DSB 修复过程中的核心地位,为更详尽揭示 DSB 修复机制提供依据。

参考文献:

[1] Scully R, Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX[J]. Mutat Res, 2013, 750(1/2): 5 – 14.

[2] Wang L, Dai W, Lu L. Osmotic Stress-induced Phosphorylation of H2AX by Polo-like-Kinase 3 Affects Cell Cycle Progression in Human Corneal Epithelial Cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(43): 29827 – 29835.

[3] Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, *et al*. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation[J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 2390 – 2396.

[4] Di-Siena S, Campolo F, Rossi P, *et al*. UV and genotoxic stress induce ATR relocalization in mouse spermatocytes[J]. Int J Dev Biol, 2013, 57(2/4): 281 – 287.

[5] An J, Huang Y C, Xu Q Z, *et al*. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression[J]. BMC Mol Biol, 2010, 11: 18.

[6] Bonner W M, Redon C E, Dickey J S, *et al*. GammaH2AX and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(12): 957 – 967.

[7] Koike M, Sugasawa J, Yasuda M, *et al*. Tissue-specific DNA-PK-dependent H2AX phosphorylation and gamma-H2AX elimination after X-irradiation *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376(1): 52 – 55.

[8] Nakada S, Yonamine R M, Matsuo K. RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1[J]. Cancer Res, 2012, 72(19): 4974 – 4983.

[9] Akopiants K, Mohapatra S, Menon V, *et al*. Tracking the processing of damaged DNA double-strand break ends by ligation-mediated PCR: increased persistence of 3′-phosphoglycolate termini in SCAN1 cells[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(5): 3125 – 2137.

[10] Nakamura A J, Rao VA, Pommier Y, *et al*. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks[J]. Cell Cycle, 2010, 9(2): 389 – 397.

[11] Peng Y, Woods R G, Beamish H, *et al*. Deficiency in the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase causes down-regulation of ATM[J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 1670 – 1677.

(**收稿**:2014-07-26;**修回**:2014-09-15)

(编辑 龙 亮)