DOI:10.16016/j.1000-5404.201505155

下调 Ku70 促进 DDB1/2 在双链断裂 DNA 聚集

曾蓓蕾,杨得娟,罗鑫荣,任国胜,程 巧 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科,分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨 DNA 损伤结合蛋白 DDB1/2 复合物在 Ku70 缺失的条件下与双链断裂 DNA(double-strand breaks,DSB)亲和力的变化及下调 DDB1 对 DSB 修复的影响。**方法** 针对人类 Ku70 构建编码 shRNA 序列的重组腺病毒并感染细胞,建立 Ku70 蛋白表达沉默的细胞株,以博来霉素(bleomycin,Bleo)或新制癌菌素(neocarzinostatin,Ncs)诱导 DNA 双链断裂,利用 DNA 损伤修复蛋白与损伤染色质的高亲和力,分段提取细胞蛋白组分,Western blot 检测 DDB1/2 在各组分的分布变化。免疫荧光检测诱导 DNA 双链断裂前后 DDB1 与损伤染色质亲和力的变化。沉默 DDB1,Western blot 检测在不同条件下 γ-H_2AX 的去磷酸化效率。**结果** 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Ku70 蛋白水平在 Ku70shRNA 重组腺病毒感染后 4d 显著下调,6d 达到最低。与 Ku70 正常细胞相比,在 Ku70 沉默后诱导 DSB,Western blot 检测结果显示 DDB1/2 主要分布在与染色质紧密结合的组分,免疫荧光同样表现出其与染色质亲和力增高。并且在 Ku 缺失的条件下,Western blot 显示下调 DDB1 能显著降低 γ-H_2AX 去磷酸化效率($P<0.01$)。**结论** 下调 Ku70 可促进 DDB1/2 在双链断裂 DNA 聚集,且下调 DDB1 影响 DSB 修复,说明 DDB1/2 可能参与了不依赖于 Ku 的双链断裂的修复途径。

[关键词] DDB1/2;染色质聚集;Ku70;DNA 损伤

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Down-regulation of Ku70 facilitates the recruitment of DNA damaged binding protein 1/2 at double-strand break DNA

Zeng Beilei, Yang Dejuan, Luo Xinrong, Ren Guosheng, Cheng Qiao (Department of Endocrinology and Breast Surgery, Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To study the binding affinity of DNA damaged binding protein 1/2 (DDB1/2) complex to double strand break (DSB) DNA and explore the effect of DDB1 down-regulation on DSB repair in the absence of Ku70. Methods Recombinant adenovirus containing shRNA targeting human Ku70 was constructed to silent Ku70 in human breast cancer cell line MDA-MB-231. The cells were treated with bleomycin or neocarzinostatin to induce DNA DSB. By use of fractionation protocol, the recruitment of DDB1/2 to chromatin was investigated. And the affinity of DDB1 to the cell nucleus in the absence of Ku70 was analyzed by in situ extraction and immunofluorescence assay. The dephosphorylation of γ-H_2AX was also assayed in the absence of DDB1. Results The protein level of Ku70 in MDA-MB-231 cells was significantly down-regulated on the 4th day after adenovirus infection, and reached the lowest on the 6th day. Compared with Ku70 normal condition, Western blotting showed that DDB1/2 was mainly distributed in the cell fractions closely bound to the chromatin in response to DSB, and immunofluorescence assay showed that the affinity of

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

[通信作者] 程 巧,电话:(023)89011649,E-mail:c914chengqiao@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.009.html(2015-11-27)

DDB1 to the chromatin was increased as well in the absence of Ku70. And Western blotting showed that the dephosphorylation level of γ-H_2AX was significantly affected by down-regulation of DDB1 in the absence of Ku70 ($P < 0.01$). **Conclusion** Down-regulation of Ku70 facilitates the recruitment of DDB1/2 at DSB DNA, and DDB1 down-regulation affects DSB repair efficiency, indicating that DDB1/2 may be involved in Ku-independent DSB repair pathway.

[**Key words**] DDB1/2; DSB; chromatin recruitment; Ku70

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, Tel: 86-23-89011649, E-mail: c914chengqiao@hotmail.com

DNA 双链断裂(double-strand breaks,DSB)严重威胁着基因组的完整性和稳定性[1]。正常情况下,真核细胞通过同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)两条修复途径对 DSB 进行修复[1-2]。而目前研究结果显示,真核细胞中尚存在不依赖 Ku 的 DSB 修复途径。这一发现正成为 DSB 修复领域的热门话题,其作用机制不同于 HR 和 NHEJ,具有明显错误修复倾向,与细胞癌变密切相关,正常情况下受 Ku 蛋白抑制[3-4]。研究证明,PARP-1[3]、ligase Ⅲ[5]和 Mre11[6]是其参与因子。进一步鉴定此途径其他候选因子,阐明其机制对理解肿瘤发生有重要的意义。本研究前期通过细胞培养氨基酸稳定同位素标记(SILAC)差异蛋白组鉴定的方法,寻找在下调 Ku70 后与 DSB 亲和力增高的候选因子[7],DDB1 以亲和力提高 3 倍引起我们的关注。本研究以人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为基础,在下调 Ku70 的表达后,通过分段提取蛋白以及有机溶剂原位提取细胞蛋白,免疫印迹及免疫荧光检测法,证实 DDB1/2 在 Ku70 下调后与 DSB 亲和力增高,同时下调 DDB1 降低 DSB 修复效率,为 DDB1/2 参与不依赖 Ku 的 DSB 修复途径提供强有力的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞株来源于 ATCC(Manassas, VA),双链断裂诱导剂博来霉素(bleomycin,Bleo)(Santa Cruze),新制癌菌素(neocarzinostatin,Ncs)、单链断裂诱导剂甲基甲烷磺酸盐(MMS,Sigma),兔抗人多克隆抗体 anti-DDB1 和 anti-DDB2(Abcam), anti-PARP1(Santa Cruz Biotechnology),anti-GAPDH(Epitomics),小鼠抗人单克隆抗体 Mre-11(Abcam),anti-Ku70、anti-Ku80 和 anti-β-actin(Santa Cruz Biotechnology),anti-γ-H_2AX(Upstate Biotechnology),辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠和羊抗兔二抗(Golden-bridge Biotechnologe, 北京),ECL 曝光试剂盒(Super Signal, Pierce),其他常用试剂由本实验室提供。DDB1 siRNA(GenePharma 公司,上海),针对人类 DDB1 合成特异性的寡核苷酸序列,其靶序列为:5′-AAGC-CGAAGACUUAAACCUGU-3′。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、病毒转染和 RNAi 干扰 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,37 ℃,5% CO_2 条件下培养。常规种板,待 50% 融合后,将 Ku70shRNA 腺病毒感染 MB231 细胞,在 4、5、6 d 时分别提取总蛋白行 Western blot 检测 Ku 蛋白表达抑制情况。DDB1 siRNA 转染细胞按照 GenePharma 转染试剂盒的说明书进行,对于 Ku70 和 DDB1 共沉默,则在 Ku70shRNA 腺病毒感染细胞 3 d 后行 DDB1 siRNA 转染。

1.2.2 诱导细胞 DNA 损伤 调整每个培养皿中细胞数量相等,待细胞贴壁后,施加 Bleo(800 μmol/L),MMS (10 mmol/L)处理 1 h 以诱导 DSB 或 SSB(single-strand breaks)形成,随后吸干培养液,置培养皿于冰上,4 ℃ PBS 洗 2 次,将细胞刮下,收集于 1.5 mL Eppendorf 管,取未经处理的细胞为对照组,进行蛋白的分段提取。

1.2.3 细胞不同组分蛋白的提取 细胞不同组分蛋白的提取,是通过浓度逐渐增高的有机溶剂盐溶液,逐步分离出与 DSB 损伤染色质亲和力不同的蛋白:fraction1、2 为相对易溶的蛋白,包括胞质、核浆蛋白以及与 DNA 亲和力较低的蛋白,fraction3 为难溶蛋白,包括与损伤染色质紧密结合的蛋白,fraction4 则是不可再提的蛋白质如组蛋白或一些骨架蛋白:用 200 μL 提取液提取约 2×10^6 个细胞(50 mmol/L Hepes pH 7.5、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT、0.05% NP40、蛋白酶和磷酸化酶抑制剂),充分混匀后,置于冰上 5 min,在 4℃ 离心机中 3 000 × g 离心 5 min,收集上清液,标记为 fraction1,提取液中添加 100 μg/mL RNase,取 200 μL,加入上述沉淀物中,冰

上放置 10 min,离心同 fraction1,收集上清,标记为 fraction2,随后,在离心沉淀物中加入 200 μL 提取液(添加0.5% NP40),冰上放置40 min,在4℃离心机中 12 000 ×*g* 离心 15 min,收集上清液,标记为 fraction3,最后,在没有溶解的沉淀物中加入 200 μL 提取液(添加 1% Triton X-100 和 450 mmol/L NaCl),充分混匀后,在液氮中冻结和解冻 3 次,超声处理直至溶液澄清,标记为 fraction4。

1.2.4 蛋白原位提取及免疫荧光 细胞种在 24 孔板中多聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上,24 h 后,施加 Bleo(800 μmol/L)处理 1h;对盖玻片上细胞进行蛋白原位提取,加入细胞提取液(50 mmol/L HEPES pH 7.5,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,300 mmol/L sucrose,2 mmol/L $MgCl_2$, 0.1% triton X-100),冰上孵育 5 min;室温下 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min;3% BSA 室温下封闭 1 h ;一抗(1∶100)室温孵育 2 h ,PBS 和 0.3% Triton 洗涤 3 次,Alexa-Fluor594 偶联羊抗鼠 IgG 抗体(1∶800)室温下孵育 1 h,1 μg/mL DAPI 室温下染色 5 min;Dako 防荧光淬灭剂封片。使用 Leica (DM IRB)显像拍照。

1.2.5 γ-H_2AX 的去磷酸化实验 为了检测 DNA 双链断裂的修复过程,取相同数目的 Ku 正常或下调的细胞种于 6 孔板中,贴壁后,转染或不转染 DDB1 siRNA,48 h 后予以 1 μmol/L Ncs 处理 10 min 诱导 DSB,PBS 洗后,立即更换新鲜培养液继续培养 0、2、4、8 h 后收集细胞,Western blot 检测各点的 γ-H_2AX 水平。

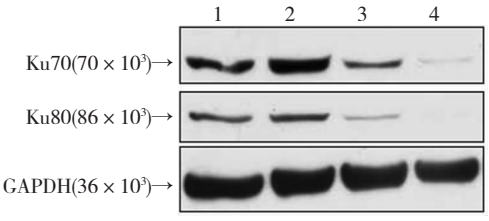
1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件分析及处理数据,两组比较采用两独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 Western blot 检测 Ku 蛋白水平

Ku70 shRNA 腺病毒感染细胞 4 d 后,Ku70 蛋白水平开始下调,6 d 达到最低水平,Ku80 蛋白水平下调趋势与之一致,8 d 后细胞开始死亡,内参照 GAPDH 蛋白的表达没有改变(图 1)。

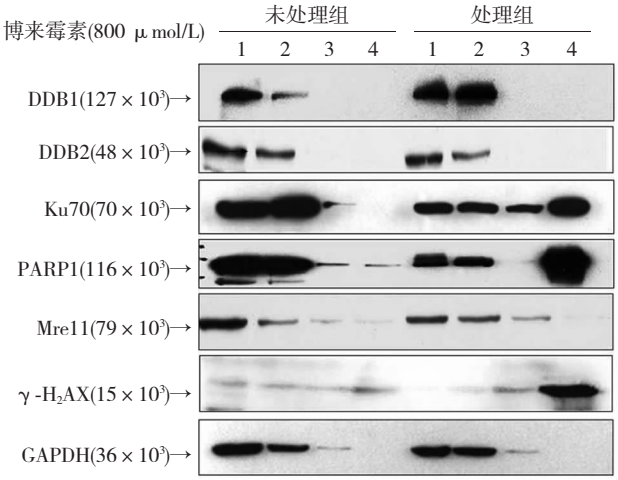


1 ~4: Ku70 shRNA 腺病毒感染细胞第 0、2、4、6 天

图 1 Western blot 检测 Ku 蛋白水平

2.2 正常情况下 DDB1/2 不向 DSB 损伤染色质聚集

没有 Bleo 处理时,没有检测到明显的 γ-H_2AX 聚集, DSB 修复蛋白 Ku70 主要分布在 fraction1、2, 其他途径修复因子如 PARP1, DDB1/2, Mre11 也分布在 fraction1,2,说明在正常情况下,DNA 修复蛋白不与染色质紧密结合。在 Bleo 诱导 DSB 形成后,fraction4 中检测到大量的 γ-H_2AX 聚集,同时 Ku70 向 fractions3、4 聚集, 而大量的 PARP1 也转移到 fraction4 中。如预期,DDB1/2 和 Mre11 分布无明显变化,内参照 GAPDH 蛋白的表达及分布没有改变(图 2)。



1:fraction1;2:fraction2;3:fraction3;4:fraction4

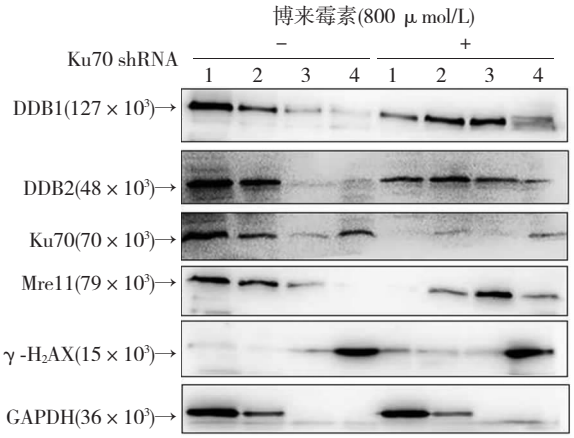
图 2 Western blot 检测 Bleo 处理前后修复蛋白在染色质的聚集情况

2.3 Ku70 下调后 DDB1/2 蛋白向 DSB 损伤染色质聚集

在 Bleo 诱导 DSB 形成后,在 Ku70 正常和缺失的细胞中,均检测到 γ-H_2AX 形成,主要分布在 fraction4;在 Ku70 正常的细胞中,Ku70 大量分布在 fraction4,DDB1/2 和 Mre11 分布在 fractions1 和 2 中,在 Ku70 下调的条件下,大量的 Mre11 转移到 fractions3 和 4 中,DDB1/2 也表现出向 fraction3,4 转移的趋势,在 fraction3 聚集的量远远多于 Ku70 正常的情况下,内参照 GAPDH 蛋白的表达及分布没有改变(图 3)。

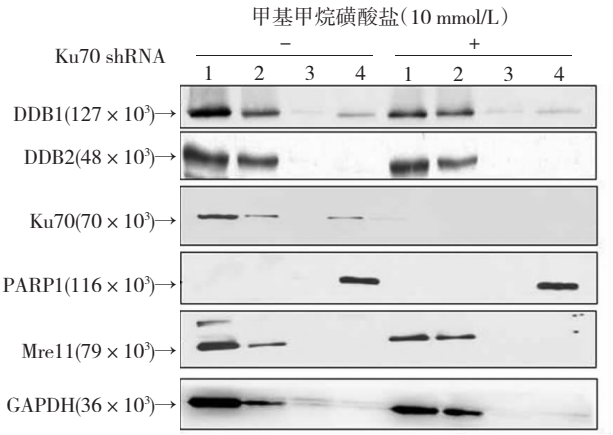
2.4 SSB 诱导形成后各修复蛋白的染色质聚集

在 MMS 诱导 SSB 形成后,在 Ku70 正常的细胞中,Ku70 主要分布在 fraction1,2,无明显染色质聚集。在 Ku70 正常和缺失的两组细胞中,均检测到 PARP1 聚集在 fraction4 中,两组细胞中,DDB1/2 和 Mre11 均主要分布在 fraction1 和 2,无明显变化,内参照 GAPDH 蛋白的表达及分布没有改变(图 4)。



−:Ku70 正常细胞组;+:Ku70 下调细胞组;1:fraction1;2:fraction2;3:fraction3;4:fraction4

图 3　Western blot 检测 Bleo 处理后 Ku 下调前后修复蛋白在 DNA 损伤染色质的聚集情况



−:Ku70 正常细胞组;+:Ku70 下调细胞组;1:fraction1;2:fraction2;3:fraction3;4:fraction4

图 4　Western blot 检测 MMS 处理后 Ku70 下调前后 DNA 修复蛋白在损伤染色质的聚集情况

2.5　免疫荧光检测 Ku70 下调前后及蛋白原位抽提前后 DDB1 在 DSB 损伤染色质的聚集情况

免疫荧光显示 Ku70shRNA 腺病毒感染后,Ku70 蛋白的表达较 shNC 组明显下调(图 5);在 Bleo 诱导 DSB 形成后,所有组别检测到 γ-H_2AX 的形成。shNC 组细胞中,蛋白质原位抽提后,DDB1 信号较未抽提组明显减少,而在 Ku70 下调细胞中,蛋白质原位抽提后,DDB1 信号较未抽提组无明显改变(图 6)。

2.6　下调 DDB1 蛋白表达对 γ-H_2AX 去磷酸化水平的影响

通过 siRNA 瞬时下调 DDB1 的表达,在转染 24 h 后,DDB1 的表达明显下调,48 h 基本消失,内参照 β-actin 蛋白的表达没有改变(图 7A)。我们选择了 DDB1 siRNA 转染 48 h 的细胞进行进一步实验,在 Ku70 正常的条件下,无论 DDB1 正常或缺失,在新鲜培养基继续培养 4 h 后,γ-H_2AX 基本上检测不到(图 7B、C),在 Ku70 缺失的条件下,DDB1 正常时,γ-H_2AX 去磷酸化延长到 8 h,下调 DDB1 的表达后 γ-H_2AX 无明显减少($P<0.01$,图 7D、E)。

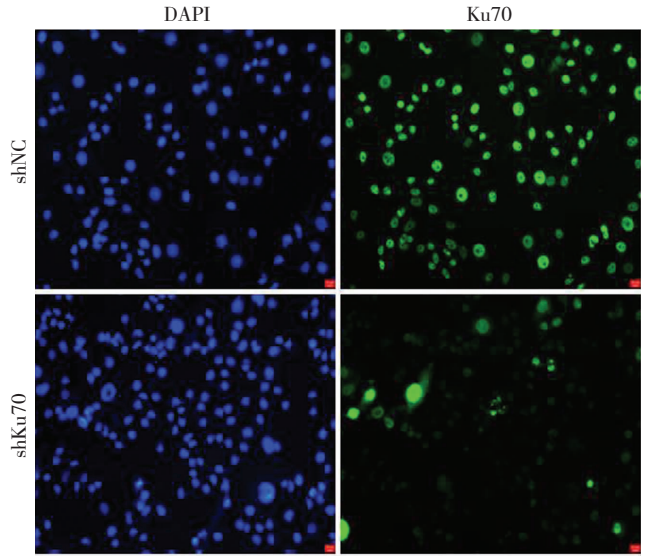
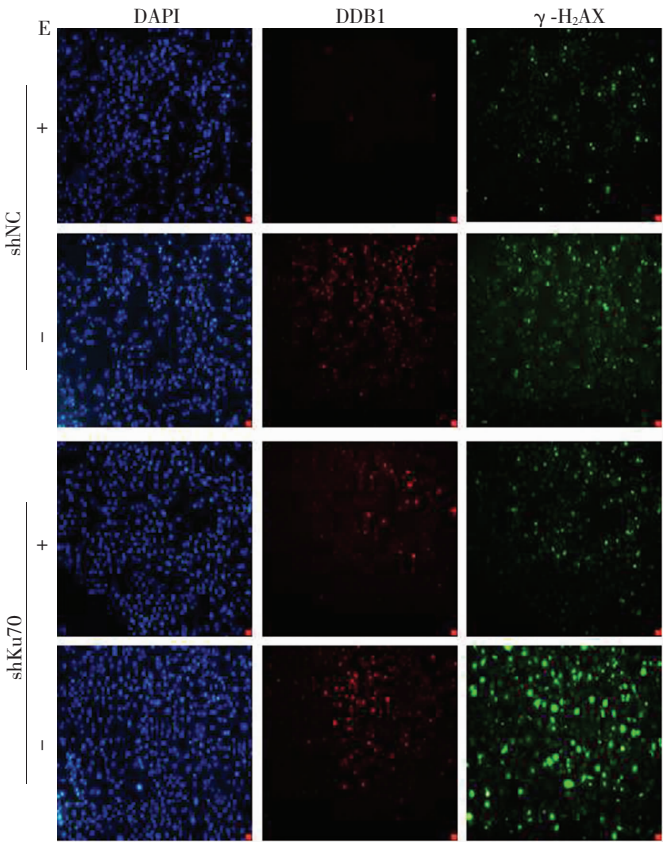
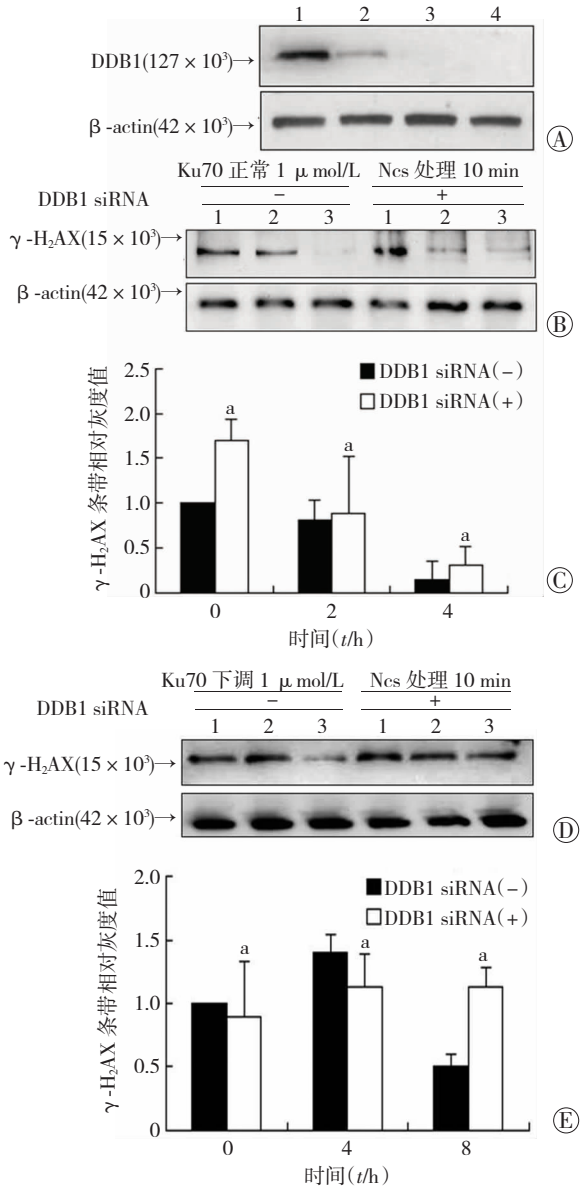


图 5　免疫荧光检测 Ku70 蛋白的表达水平　(DAPI×200)



E:蛋白质原位抽提;+:蛋白质原位抽提后;−:蛋白质原位抽提前

图 6　免疫荧光检测 Ku70 下调前后及蛋白原位抽提前后 DDB1 在 DSB 损伤染色质的聚集情况　(DAPI×100)



A:DDB1 siRNA 转染后 DDB1 蛋白的表达 1~4:DDB1 siRNA 转染细胞 0、24、48、72 h;B 和 C:Ku70 正常时下调 DDB1 对 γ-H_2AX 去磷酸化水平的影响及半定量分析 1~3:新鲜培养基继续培养 0、2、4 h;D 和 E:Ku70 缺失时下调 DDB1 对 γ-H_2AX 去磷酸化水平的影响及半定量分析 1~3:新鲜培养基继续培养 0、4、8 h;a:$P<0.01$,与 DDB1 siRNA(-)比较

图 7 Western blot 检测 Ku70 正常和缺失时下调 DDB1 对 γ-H_2AX 去磷酸化水平的影响

3 讨论

核酸切除修复途径(NER)修复扭曲畸变的 DNA 双链,这些损伤灶不仅包括环丁烷嘧啶二聚体(CPDs)和 6-4 光产物(6-4pps),还包括活性氧自由基[8]及顺铂诱导的 DNA 损伤,甚至 DNA 双链上存在的最常见的异常碱基位点(AP)[9]及由吸烟引起的 DNA 损伤等[10]。其基本机制已得到广泛、深入的研究,其过程包括:①损伤灶识别;②损伤核苷酸切除;③DNA 合成修复。DDB 复合物,作为 GG-NER 最重要的 DNA 损伤识别因子,是泛素 E3 连接酶复合物 DDB1-CUL4A^{DDB2}的组成部分,由 DDB1(p127)和 DDB2(p48)异二聚体构成,目前认为,DDB2 首先识别并结合各种类型 DNA 损伤灶,然后募集 DDB1 及 CUL4 形成复合物。而后 DDB1-CUL4A^{DDB2}泛素化组蛋白,改变损伤 DNA 构型,自泛素化 DDB2 及 XPC,增加 XPC 与损伤灶的亲和力,同时减低 DDB2 与损伤灶的亲和力并最终导致 DDB2 的降解,从而促使下游 DNA 修复因子的募集[11]。尽管 GG-NER 参与多种 DNA 损伤的修复,并且其修复过程中染色质重构方式与 DSB 修复过程的重构方式相同[12],但并没有直接证据表明 DDB 复合物在某些情况下参与 DSB 修复。反而,NER 修复过程可以诱导 DNA 双链断裂的发生[13],DDB1 缺失亦能导致细胞周期检测点的激活和 DNA 双链的断裂[14]。近年来,DDB2 被发现受 PARP1 催化修饰,抑制其自泛素化,增强其稳定性,延长与受损 DNA 结合的时间,并进一步募集染色质变构酶 ALC1,从而调节 DNA 修复效率[15],免疫共沉淀亦证明 PARP1 与 DDB2 形成紧密复合物,共同参与损伤 DNA 的识别[16]。DDB 蛋白作为 PARP1 的下游修复因子,是否在 DSB 或 SSB 修复过程中也发挥同样作用尚不清楚。

本研究前期在下调 Ku70 的基础上,通过 SILAC 差异蛋白组鉴定的方法,发现在下调 Ku70 后,PARP1 与 DSB 亲和力提高 3.23 倍,而 DDB1 提高 3 倍。任何高通量筛选必须进行后期验证。我们通过 Ku70shRNA 腺病毒感染 MB231 细胞下调 Ku70 蛋白的表达,Ku80 蛋白失去 Ku70 蛋白的相互稳定作用,也随之下调。通过 DSB 诱导剂 Bleo 或 Ncs 诱导 DSB 形成;分段提取蛋白,按照与损伤染色质亲和力由低到高,分离出 fraction1-4。在 Bleo 或 Ncs 诱导 DSB 发生后,γ-H_2AX 作为 DSB 的特异性指标[17],主要分布在 fraction4 中,Ku70 明显向核内转移并主要分布于 fraction4 中,这符合 Ku70 作为 NHEJ 的关键因子,应对 DSB 所发生的定位变化,也符合 NHEJ 修复途径在修复 DSB 时的主导地位。Mre11 主要分布在 fraction1 和 2 中,作为 HR 途径中重要的核酸内切酶[4],本分段提取蛋白法不能探测到其染色质聚集,可能是因为相对 NHEJ,HR 并非修复 DSB 的最主要途径,Mre11 仅在 S 后期和 G_2 期细胞中发挥作用。然而,PARP1 在 Bleo

处理后大量聚集在 fraction4 中,这可能是因为无论 Bleo 或 Ncs,所诱导的 DNA 链损伤都是以单链断裂(single strand breaks,SSB)为主,其诱导的 SSB 与 DSB 比例分别为 6∶1 和 5∶1[18-19]。PARP1 作为修复 SSB 的碱基切除修复途径(BER)的关键因子[20],在 Bleo 处理后会大量聚集在损伤染色质。在 Ku70 正常的条件下,DDB1/2 分布于 fraction1 和 2 中,提示 DDB 复合物未被任何形式 DNA 链断裂所募集(图 2)。而在 Ku 下调的条件下,Mre11 明显向 fraction4 移动,在 fraction3 大量聚集,近年来,有报道 Mre11 参与不依赖 Ku 的 DSB 修复途径[3-4,6],本结果与此观点吻合。同时,DDB1/2 在 fraction3 聚集的量远远多于 Ku70 正常或无 DSB 的情况下,提示在 Ku70 缺失情况下,DDB 复合物能够对 DNA 链断裂做出应答,在损伤染色质聚集。

为验证 DDB1/2 是针对 SSB 的应答还是针对 DSB 的应答,我们使用 SSB 诱导剂-甲基甲烷磺酸盐(MMS)诱导 Ku 正常和下调细胞产生 SSB(图 4),发现在 MMS 诱导 SSB 后,PARP1 在两组细胞中均分布在 fraction4 中,如上所述,这是因为 PARP1 是 SSB 修复的关键因子,而 DDB1/2 和 Mre11 仍分布在 fraction1、2 中,提示无论 Ku70 缺失与否,DDB 复合物都不对 SSB 做出应答。从而说明在 Ku70 缺失情况下,DSB 而不是 SSB 募集 DDB1/2 在损伤染色质的聚集。同样,我们通过免疫荧光再次验证了这一结果,细胞爬片固定前,有机溶剂对细胞蛋白进行预提,去除与染色质亲和力小的蛋白。镜下形态学表现为细胞体积缩小,胞质消失,仅留胞核。Bleo 处理后的细胞,免疫荧光显示 γ-H_2AX 是明显的,未经预提的细胞中,DDB1 的表达信号强,预提后,DDB1 信号消失,说明此时 DDB1 与核内物质亲和力小,能轻易去除掉。然而,在 Ku70 缺失的细胞,预提后 DDB1 仍保留强信号,说明其与核内物质亲和力明显上升(图 5)。

因为 γ-H_2AX 去磷酸化与 DNA 双链断裂修复几乎同时发生[21],我们可通过检测 γ-H_2AX 的去磷酸化过程来反映 DSB 修复过程。DDB1 沉默细胞中 DSB 修复效率实验研究结果显示,在 Ku70 正常的条件下,无论 DDB1 正常或缺失,在 Ncs 诱导 DNA 双链断裂损伤发生后,新鲜培养基继续培养 4 h 后,γ-H_2AX 基本上检测不到,说明正常情况下,本实验条件下所诱导的 DSB 在 4 h 内能够得到修复,这与 Jerome 等[22]曾报道的正常情况下 DSB 修复过程相似,同时提示 Ku 正常时 DDB1 缺失并不影响 DSB 的修复;然而,在 Ku 缺失的条件下,γ-H_2AX 去磷酸化延长到 8 h,这可以归结于不依赖于 Ku 的 DSB 修复效率远低于 NHEJ,更重要的是在 Ku 沉默的细胞中,下调 DDB1 的表达,γ-H_2AX 在 8 h 时不能减少,表明 DNA 双链断裂修复不能完成。因此,在 Ku 缺失时,下调 DDB1 可以影响 DSB 的修复,DDB1 很可能参与不依赖 Ku 的 DSB 修复途径。

综上所述,本研究结果显示,下调 Ku70 促进 DDB1/2 在双链断裂 DNA 聚集,DDB 复合物可能参与不依赖 Ku 的 DSB 修复途径。然而,其具体作用机制还不清楚,但 DDB2 能够受 PARP1 催化修饰,抑制其自泛素化,促使与受损 DNA 结合,而 PARP1 在 Ku70 缺陷时修复 DSB 处于极上游的地位已得到公认,我们推测下调 Ku70 后 DDB 复合物被 DSB 募集这一过程可能是 PARP1 依赖的。或者是因为 DDB 与 Ku70 竞争结合 DSB 旁的 AP 位点[23],Ku 的下调使其得以释放。接下来我们将以双链断裂底物质粒为基础,进一步研究,以期揭示 DDB 复合物在 DSB 染色质聚集的机制。

参考文献:

[1] Bjorkman A, Qvist P, Du L, *et al*. Aberrant recombination and repair during immunoglobulin class switching in BRCA1-deficient human B cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(7): 2157-2162. DOI:10.1073/pnas.1418947112

[2] Jackson S P, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. Nature, 2009, 461(7267): 1071-1078. DOI:10.1038/nature08467

[3] Cheng Q, Barboule N, Frit P, *et al*. Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(22): 9605-9619. DOI:10.1093/nar/gkr656

[4] Truong L N, Li Y, Shi L Z, *et al*. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(19): 7720-7725. DOI:10.1073/pnas.1213431110

[5] Liang L, Deng L, Nguyen S C, *et al*. Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(10): 3297-3310. DOI:10.1093/nar/gkn184

[6] Rahal E A, Henricksen L A, Li Y, *et al*. ATM regulates Mre11-dependent DNA end-degradation and microhomology-mediated end joining[J]. Cell Cycle, 2010, 9(14): 2866-2877.

[7] 程巧, 厉红元, 王小毅, 等. 沉默 Ku70 促进 PARP1、lig-

ase3 和 XRCC1 在 DNA 双链断裂染色质聚集[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1497 - 1501.

[8] Wang Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species[J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21(2): 276 - 281. DOI:10.1021/tx700411g

[9] Kim N, Jinks-Robertson S. Abasic sites in the transcribed strand of yeast DNA are removed by transcription-coupled nucleotide excision repair[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(13): 3206 - 3215. DOI:10.1128/MCB.00308-10

[10] Setlow R B. Human cancer: etiologic agents/dose responses/DNA repair/cellular and animal models[J]. Mutat Res, 2001, 477(1/2): 1 - 6.

[11] Yeh J I, Levine A S, Du S, *et al*. Damaged DNA induced UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB) dimerization and its roles in chromatinized DNA repair[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(41): E2737 - E2746. DOI:10.1073/pnas.1110067109

[12] Aydin O Z, Vermeulen W, Lans H. ISWI chromatin remodeling complexes in the DNA damage response[J]. Cell Cycle, 2014, 13(19): 3016 - 3025. DOI: 10.4161/15384101.2014.956551

[13] Wakasugi M, Sasaki T, Matsumoto M, *et al*. Nucleotide excision repair-dependent DNA double-strand break formation and ATM signaling activation in mammalian quiescent cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(41): 28730 - 28737. DOI: 10.1074/jbc.M114.589747

[14] Lovejoy CA, Lock K, Yenamandra A, *et al*. DDB1 maintains genome integrity through regulation of Cdt1[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(21): 7977 - 7990.

[15] Pines A, Vrouwe M G, Marteijn J A, *et al*. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1[J]. J Cell Biol, 2012, 199(2): 235 - 249. DOI:10.1083/jcb.201112132

[16] Robu M, Shah R G, Petitclerc N, *et al*. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(5): 1658 - 1663. DOI:10.1073/pnas.1209507110

[17] Mah L J, El-Osta A, Karagiannis T C. gammaH_2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair[J]. Leukemia, 2010, 24(4): 679 - 686.

[18] Tounekti O, Kenani A, Foray N, *et al*. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway[J]. Br J Cancer, 2001, 84(9): 1272 - 1279. DOI:10.1054/bjoc.2001.1786

[19] Dedon P C, Goldberg I H. Sequence-specific double-strand breakage of DNA by neocarzinostatin involves different chemical mechanisms within a staggered cleavage site[J]. J Biol Chem, 1990, 265(25): 14713 - 14716.

[20] Strom C E, Johansson F, Uhlen M, *et al*. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(8): 3166 - 3175. DOI:10.1093/nar/gkq1241

[21] Caron P, Aymard F, Iacovoni J S, *et al*. Cohesin protects genes against gammaH_2AX Induced by DNA double-strand breaks[J]. PLoS Genet, 2012, 8(1): e1002460. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002460

[22] Jerome D, Christine D, Patrick C, *et al*. DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks[J]. J Biol Chem, 2005, 280(8): 7060 - 7069. DOI:10.1074/jbc.M410746200

[23] Kosova A A, Lavrik O I, Hodyreva S N. The role of Ku antigen in the repair of apurinic/apyrimidinic sites in DNA[J]. Mol Biol (Mosk), 2015, 49(1): 67 - 74.

(收稿:2015-05-29;修回:2015-07-29)

(编辑 汪勤俭)