

DOI: 10.13376/j.cbls/2014164

文章编号: 1004-0374(2014)11-1157-09



徐冬一 教授

徐冬一, 博士, 北京大学生命科学学院研究员。自从2005年以来, 一直从事与核酸代谢和(或)人类疾病有关的多蛋白质复合物的纯化和研究, 发现了新的DNA修复相关蛋白RMI2、Rif1和XLF2等。迄今最具科学意义的贡献是发现了第一个具有生理功能的RNA拓扑异构酶。在*Nat Neurosci*、*Mol Cell*、*Genes Dev*和*EMBO J*等SCI期刊发表论文10余篇。实验室主要研究方向包括:(1)建立与DNA修复相关的蛋白质相互作用网络;(2)寻找与DNA修复和(或)人类疾病相关的新蛋白质;(3)了解RNA拓扑异构酶在RNA代谢和脆性X染色体综合征(Fragile X syndrome, FXS)中的功能。

DNA双链断裂的非同源末端连接修复

严振鑫, 徐冬一*

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要: 细胞内普遍存在的DNA双链断裂(DSB)可通过同源重组(HR)或非同源末端连接(NHEJ)修复。由于HR仅在有相同染色体作为模板的时候进行, 因此, NHEJ通常为主要的修复方式。在NHEJ中, DSB末端首先由Ku识别, 接着由核酸酶、聚合酶在Ku与DNA-PKcs协助下加工, 并由连接酶IV-XRCC4-XLF连接。NHEJ底物类型多样, 末端的修复常包含反复加工的过程, 导致修复产物通常无法复原损伤前的序列。虽然无法确保准确修复DNA, NHEJ仍对维持基因组的稳定性具有重要的意义。对NHEJ的研究有助于理解癌症的发生机制并将促进癌症的治疗。

关键词: 双链断裂; 非同源末端连接; Ku; DNA-PKcs; 连接酶IV; XRCC4; XLF

中图分类号: Q343 **文献标志码:** A

Role of nonhomologous end joining pathway in the repair of DNA double-strand breaks

YAN Zhen-Xin, XU Dong-Yi*

(School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: As a deleterious but common form of DNA damage, DNA double-strand breaks (DSB) can be repaired by both homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ) pathways. As HR takes place only when an intact homologous chromatin is prepared as a template, NHEJ is the primary pathway to repair DSB. DSB is initially recognized by Ku. With the help of DNA-PKcs, Ku recruits nucleases and polymerases for end processing and ligase IV-XRCC4-XLF for the final ligation step. Although the structural diversity of break ends and iterative processing of DNA ends together make NHEJ an error-prone pathway, it plays a significant role in the

收稿日期: 2014-09-30

*通信作者: E-mail: xudongyi@pku.edu.cn

maintenance of genome stability. Research on the mechanism of NHEJ will shed light on the mechanism of oncogenesis so as to develop better strategies for cancer therapy.

Key words: double-strand break; nonhomologous end joining; Ku; DNA-PKcs; ligase IV; XRCC4; XLF

作为最重要的遗传物质, DNA 持续发生不同程度的损伤, 其中双链断裂 (double-strand break, DSB) 最为严重且普遍存在。每个细胞每天大约经历 10~100 次 DSB^[1-2]。造成 DSB 的外源因素有自然界存在的电离辐射 (ionizing radiation) 以及人为的核武器 / 核泄漏、放射造影 (X 射线、 γ 射线)、化疗药物和机械损伤等, 内源因素包括代谢产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、拓扑异构酶重连缺陷以及在单链断裂 (single-strand break, SSB) 处的复制^[1-5]。淋巴细胞中还存在发育性的、程序性的 DSB, 即 V(D)J 重组和类别转换重组 (class-switch recombination, CSR)^[6]。DSB 直接破坏染色体的物理连续性, 若无法及时修复, 可能因整段染色体的丢失而造成细胞衰老、凋亡或癌变^[2,7]。DSB 可通过两种途径修复: 同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ)。HR 以完全相同的染色体作为模板执行精确的修复, 但仅发生在 DNA 经历或完成复制的 S 和 G2 期^[8]。NHEJ 可在整个细胞周期发生 (有丝分裂期可能受抑制), 因为修复不需要模板, 只基于断裂末端的结构而容易产生错误 (包括缺失、插入和点突变)^[9]。哺乳动物细胞中的 DSB 主要通过 NHEJ 修复^[2]。本文以参与蛋白质的功能为重点介绍哺乳动物中经典 NHEJ 修复途径, 并简介替代 NHEJ 途径 (alternative-NHEJ, aNHEJ)、V(D)J 重组及 CSR 的基本过程, 最后分析 NHEJ 的进化以及 NHEJ 与 HR 的联系。

1 NHEJ的基本过程

NHEJ 的基本过程是: 双链断裂产生后, Ku 识别断裂末端并最先与断裂 DNA 结合, 随后 Ku 招募 DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) 在空间上排列并稳定两个断裂末端, DNA-PKcs 通过自磷酸化和磷酸化下游蛋白传递修复信号, DNA 末端加工蛋白 (核酸酶、聚合酶等) 将断裂末端加工成适合连接的结构, 最后连接酶 (Ligase) IV-XRCC4 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4)-XLF (Xrcc4-like factor) 复合体执行连接功能^[10] (图 1)。Ku、DNA-PKcs、Ligase IV、XRCC4 及 XLF 组成 NHEJ 核心

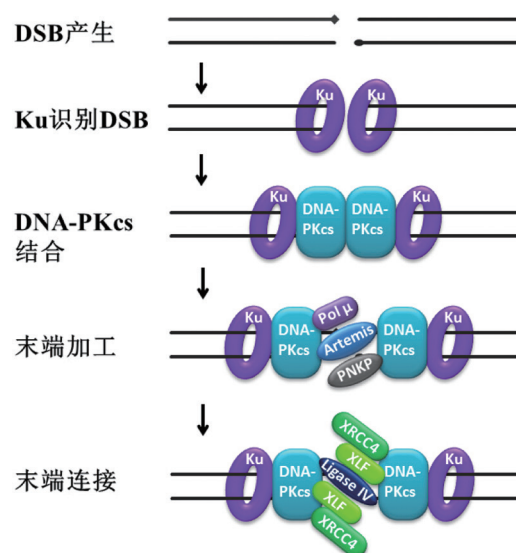
蛋白^[12]。其中, Ku 在最开始的识别及招募过程中的作用较为明确, 下游的一系列加工和连接没有明确的顺序, 是一个反复进行的过程^[10]。

2 NHEJ的主要参与蛋白

2.1 DNA-PK复合体

2.1.1 Ku

Ku 是 Ku70 和 Ku80 组成的异二聚体, 根据来源患者的姓名 (首字母 K.U.) 及蛋白质的大小 (70 kDa/83 kDa) 命名^[13-14]。两个蛋白亚基能自组装形成稳定的环状二聚体, 以套环结构结合 DNA 断裂末端并能向内滑动^[15-17]。在整个细胞周期, Ku 能在双链断裂产生后数秒之内与多种断裂末端 (黏性末端或平末端) 结合^[18-19], 而且这种结合不依赖于末端的 DNA 序列^[16]。Ku 在核内的高表达以及高 DNA 亲和性使之成为理想的 DSB 感受器, 能识别并结合短至 18 bp 的双链 DNA^[20]。结合 DNA 后, Ku 能在空间上拉近和排列两个断裂末端, 并保护末端免受不必要的加工, 比如 Ku 能阻止核酸外切



NHEJ过程中, Ku最先识别、结合DSB末端, 并招募下游蛋白。Artemis与DNA-PKcs形成复合体发挥作用, XLF-XRCC4-Ligase IV在空间上稳定两个断裂末端并由Ligase IV执行连接功能, 单位复合体中三者的比例为2:2:1^[2,11]。Ku下游蛋白的结合及作用没有明确的顺序, 是个反复作用的过程。

图1 NHEJ的基本过程

酶(exonuclease 1, Exo1)与DNA末端结合^[15,21-23]。由于Ku直接与所有NHEJ核心蛋白及大多数DNA末端加工蛋白互作,在结合DNA后,Ku可作为NHEJ的枢纽,招募其他修复蛋白并提供作用的平台^[10]。值得注意的是,Ku还能作为裂合酶直接加工DNA末端(见下文)^[24]。缺失Ku70或Ku80的细胞或小鼠都对DSB更敏感,缺失小鼠有严重免疫缺陷且容易产生淋巴瘤^[25-27]。另外,Ku还参与转录调控和细胞凋亡的抑制,这些功能可能独立于Ku在NHEJ中的作用^[17]。

2.1.2 DNA-PKcs

DNA-PKcs属于PIKK(phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinase)家族,是生物体内最大的激酶(469 kDa),也是唯一通过与DNA末端结合而激活活性的激酶^[20,28-29]。DNA-PKcs的N端部分形成一个开环状的“钳子”结构,为DNA提供了结合通道^[30-31]。Ku识别DNA后,迅速招募DNA-PKcs至断裂末端,二者与双链DNA结合形成DNA-PK复合体^[32]。与此同时,Ku由DNA末端向内移动,DNA-PKcs的C端发生构象改变并激活其激酶活性^[33-34]。结合后DNA-PKcs与Ku一起稳定两个断裂末端并阻断核酸酶、聚合酶与DNA末端的结合^[21,35]。DNA-PKcs可在体外磷酸化Ku、XRCC4、Ligase IV、XLF及其他许多NHEJ相关蛋白,但这些磷酸化作用并非NHEJ所必需^[10]。最近发现DNA-PKcs对WRN(Werner)的磷酸化可促进NHEJ^[36]。值得注意的是,DNA-PKcs的自磷酸化或被ATM、ATR磷酸化可调控NHEJ^[37-40]。比如,第2609位苏氨酸及附近位点丝氨酸/苏氨酸的磷酸化促进它与Ku分离并从DNA末端释放^[41-42],同时能磷酸化并结合Artemis,促进后者的核酸酶活性(见下文)^[43]。

2.2 Ligase IV-XRCC4-XLF复合体

2.2.1 XRCC4-Ligase IV复合体

NHEJ最终需要通过DNA Ligase IV完成连接反应。Ligase IV包括N端的催化结构域和C端的两个串联BRCT(breast cancer associated carboxy-terminal)结构域^[44]。没有XRCC4参与时,Ligase IV能连接DNA单链上的缺口,也可连接互补的双链突出末端(4个核苷酸)^[45]。在XRCC4参与下,Ligase IV能连接含有2 bp微同源序列以及1个核苷酸缺失的末端,Ku的参与能大大增强连接效率并能连接非互补的末端^[46]。XRCC4-Ligase IV可以在双链断裂的一条链不适合连接时只连接另一条链^[46]。XRCC4-Ligase IV还可招募各种DNA末端加工蛋

白,起和Ku类似的枢纽和支架作用。

2.2.2 XRCC4-XLF纤维束

XLF(也叫Cernunnos)在2006年被两个研究组分别通过酵母双杂交筛选XRCC4互作蛋白和对免疫缺陷患者的研究独立发现,是NHEJ途径核心蛋白中最近被确定的^[11,47]。XLF下调或缺失会造成DNA修复缺陷,使细胞对辐射及抗癌药物敏感^[11,48]。XLF本身不具有酶活性,但它在DNA断裂末端起类似支架的作用以稳定Ligase IV-XRCC4,并通过重新腺苷酸化Ligase IV促进DNA末端,特别是错配末端的连接^[49-51]。晶体学及电镜的研究发现XLF与XRCC4形成螺旋的纤维状结构,并能进一步组装成有弹性的束状多聚体结构^[52-55]。螺旋结构提供了带正电荷的凹槽以结合DNA并排列断裂末端^[54]。值得注意的是,DNA以左手螺旋的形式缠绕在核小体的外侧的组蛋白上,XLF-XRCC4细丝也是左手螺旋,所以后者可能在核小体解聚后稳定DNA链^[56]。DNA-PKcs的磷酸化作用及Ligase IV均可以使纤维解聚,可能调控了纤维的动态组装^[57-58]。Ligase IV的BRCT结构域与XRCC4潜在的四聚化区域部分重叠,所以纤维的组装可能依赖于XRCC4的四聚化^[53,59],也可能是Ligase IV的催化结构域限制了XLF与XRCC4的结合^[58]。

2.3 DNA断裂末端加工蛋白

连接反应的前提是DNA末端为可连接的5'-磷酸(5'-P)、3'-羟基(3'-OH)的结构^[6]。IR等损伤造成的DSB末端通常不是可连接结构。DSB末端附近的碱基缺失也会阻断连接。细胞中存在诸多蛋白质负责将断裂末端加工成可连接的形式,同时核酸酶负责切割损伤DNA,聚合酶负责加入新核苷酸。这些蛋白质通常由Ku或XRCC4招募^[10,56,60]。

2.3.1 APTX、PNKP、APLF

APTX、PNKP、APLF这三个蛋白质同时参与碱基切除修复(base excision repair, BER)及单链断裂修复(single strand break repair, SSBR)过程^[6]。三者均具有N端FHA(Forkhead associated)结构域,能与XRCC4结合(参与BER及SSBR时结合XRCC1)^[60-61]。中断的Ligase IV连接反应可使DNA 5'末端腺苷酰化,APTX(Aprataxin)可移除腺苷酸并重新起始连接过程^[62]。IR及ROS可造成无法直接连接的5'-羟基、3'-磷酸断裂末端,PNKP(polynucleotide kinase/phosphatase)的激酶结构域能磷酸化5'末端,其磷酸酶结构域则能移除3'末端的磷酸,由此产生适合连接的末端结构^[63]。APLF(Aprataxin and PNKP-

like factor) 可作为内切酶和 3' 外切酶加工断裂末端, 还可识别断裂附近被多聚 ADP-核糖 (poly ADP-ribose) 修饰的染色质, 与 Ku、XRCC4 一起稳定修复结构^[6,64]。

2.3.2 Ku

IR 可在 DSB 末端产生碱基缺失位点, 包括 5' 脱氧核糖-5-磷酸 (5' deoxyribose-5-phosphate, 5'-dRP) 和末端附近的碱基缺失 (apurinic/apyrimidinic, AP)。该结构也是 BER 修复的中间产物, 可在 BER 中断的时候积累, 常见于免疫球蛋白的 CSR 过程^[65]。最新发现 Ku 具有 5'-dRP/AP 裂合酶活性, 可在缺失位点的 3' 一侧进行切除^[24]。

2.3.3 酪氨酰 DNA 磷酸二酯酶 (Tdp1、Tdp2)

拓扑异构酶 (Topoisomerases, 包括 Top I 和 Top II) 通过切割-连接交替进行以打开 DNA 超螺旋结构, 使 DNA 复制和转录过程得以进行。切割后, 拓扑异构酶上的酪氨酸与切割位点 3'-或 5'-磷酸共价结合 (分别对应 Top I、Top II), 形成 DNA-Top I/II 复合物^[66]。拓扑异构酶的抑制剂可抑制连接反应而积累共价连接中间产物^[67]。酪氨酰 DNA 磷酸二酯酶 (tyrosyl DNA phosphodiesterases) 包括 Tdp1 和 Tdp2, 二者可分别移除与 3'/5'-磷酸连接的 Top I/II^[68-69]。TdpI 还可移除其他 3'-磷酸结构, 包括 IR 后常见的 3'-磷酸乙醇酸^[70]。

2.3.4 核酸酶 (Artemis、Metnase、WRN、Mre11)

参与 DSB 末端加工的蛋白质大多具有多种功能。Artemis 本身具有 5'→3' 外切酶活性, 与 DNA-PKcs 形成复合物并被后者磷酸化后可获得内切酶活性, 能切割突出末端以及 V(D)J 重组过程形成的发夹结构^[43]。Artemis 倾向于将 5' 突出切割为平末端, 将 3' 突出切割为带 4 个核苷酸的 3' 突出。Artemis 还能移除 3'-磷酸乙醇酸^[71]。Artemis 缺失会引起辐射敏感性重症联合免疫缺陷 (radiosensitive severe combined immune deficiency, RS-SCID)^[43]。仅存在于灵长类动物的 Metnase 具有内切酶和甲基转移酶活性, 可切割单链 DNA 及单双链 DNA 连接处, 但在 NHEJ 中的效率不如 Artemis^[72]。WRN 具有 3'→5' 外切酶和解旋酶活性, 与 Ku 及 XRCC4 结合可激活其外切酶活性^[73]。此外, DNA 损伤应答的经典蛋白 Mre11 (Meiotic recombination 11) 也作为 3'→5' 外切酶及内切酶参与 NHEJ^[74]。

2.3.5 聚合酶 X 家族 (Polλ、Polμ、TdT)

NHEJ 中在缺口处合成互补链的功能由聚合酶 X 家族执行, 包括 Polλ (polymerases λ)、Polμ (polymerases

μ) 和 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)^[75]。三者对模板链的依赖性、序列互补性的需求依次降低: Polλ 的合成高度依赖模板链, 需要引物与模板链互补; TdT 完全独立于模板链, 不需要碱基配对; Polμ 既能依赖也能不依赖模板链进行合成, 能使用另一断裂末端作为模板选择加入互补的碱基^[12,76]。结构上, 三者的 N 端均具有 BRCT 结构域, 能与 Ku 及 XRCC4-Ligase IV 形成复合体^[77]。三者独立的合成都不具有校正功能而容易出错, 然而当存在 Ku 和 XRCC4-Ligase IV 时, Polλ 能进行精确的合成, Polμ 则能以不连续链为模板进行跨损伤合成^[76-78]。TdT 仅存在于早期分化阶段的 B/T 淋巴细胞中, 所以只参与 V(D)J 重组过程的 NHEJ^[79]。

3 NHEJ 修复策略及其选择

3.1 试错循环式修复策略

DSB 末端通常需要经过加工。单次加工即产生可连接末端的概率较低, 所以 NHEJ 可能包含“尝试连接-加工-再尝试连接(-再加工)”的反复循环过程^[6,80]。循环的终止有多种情况。首先, 带 5'-P、3'-OH 的末端被直接连接即可跳出循环。同时, 由于 Ligase IV 在 XRCC4-XLF 和 Ku 的参与下能连接非互补末端 (低保真性、容错性), 包含错配的末端可能被连接, 循环同样终止, 其中的碱基错配可由 BER 进一步修复^[12]。此外, 循环可在未完成连接的情况下终止: 当有限次数的加工失败后, 末端可进行持续切割, 同时 MRN (Mre11/Rad50/NBS1)、Exo1 促使 Ku 从末端释放, 产生长片段的 3' 突出 DNA 并由 aNHEJ 或 HR 接管修复过程^[8,81]。

3.2 顺序选择与随机选择

由于末端加工蛋白底物的重叠性 (如外切酶和内切酶), 相同末端能由不同的酶加工, NHEJ 应如何在这些酶中选择, 如何在切割以及跨损伤合成 (Polμ) 中选择。修复可能按以下顺序进行: 首先尝试不经加工直接连接; 其次考虑引入 APTX、Tdp1/2 移除损伤碱基, 引入 Ku 移除碱基缺失核苷酸后尝试连接或跨损伤合成; 最后考虑招募外切酶、内切酶进行多碱基甚至大片段的切除后再进行连接。这种选择顺序被认为能最大限度保留现有的碱基序列 (遗传信息)^[12]。其他解释是加工蛋白通过一种随机的方式选择, 加工蛋白在 DSB 附近的丰度或对底物 (断裂末端) 的亲性能影响这种随机性^[12]。此外, 也可能在 NHEJ 中起枢纽作用的 Ku、XRCC4 根据特定末端结构招募特定的加工蛋白,

这需要更多的研究证据。

4 程序性DSB及NHEJ

4.1 V(D)J重组

V(D)J 重组和 CSR 都是生理的、程序性的 DSB 发生及 NHEJ 修复过程,二者均促进产生抗原受体基因的多样性^[6]。V(D)J 重组仅存在于早期的 B 细胞和 T 细胞中,该过程可分为断裂阶段和修复阶段。首先,淋巴细胞特异的 RAG1/2 (recombination activating gene 1/2) 复合体识别基因组上两个间隔的重组信号序列 (recombination signal sequences, RSS) 并在两个 RSS 序列的外侧进行切割。两个 RSS 外侧的序列称为编码末端,断裂时产生发夹结构。修复阶段始于 Artemis-DNA-PKcs 复合体打开发夹结构,随后两个编码末端被加工并连接,断裂的染色体得以重新连接^[43]。两个 RSS 之间的序列称作信号序列,可不依赖 Artemis 被 NHEJ 连接成环^[1]。

4.2 类别转换重组(CSR)

经过 V(D)J 重组的成熟 B 细胞在抗原刺激下发生 CSR,通过切割和重新连接来重新排列免疫球蛋白重链基因,并伴随大片段 DNA 删除^[82]。B 细胞特异的胞嘧啶脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 分别在两个间隔的 S (switch) 区将胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U),接着 UNG (uracil DNA glycosylase) 将 U 切除,随后 APE (apurinic/aprimidinic endonuclease) 切割该碱基缺失位点产生单链断裂,两条链上的两个断裂位点靠近时即可产生 DSB(可能有错配修复途径参与其中)^[83]。上下游 S 区经 NHEJ 相连后即产生删除型重组,使可变区的 V(D)J 片段与下游编码 IgG、IgA 或 IgE 的不同恒定区外显子连接,由此产生不同抗体类型。若 AID 发生脱靶效应(识别非 S 区),可产生损伤性 DSB,容易造成染色体异位^[82]。

5 aNHEJ/Backup-NHEJ/MMEJ

除了依赖于 Ku70/80 的经典的 NHEJ (classical/canonical-NHEJ, cNHEJ) 外,细胞中还存在不依赖于 Ku70/80 的其他 NHEJ 途径,称为替代 NHEJ (aNHEJ) 或备用 NHEJ (backup NHEJ)。目前并不清楚 aNHEJ 只包括一种途径,还是多种途径。微同源末端连接 (microhomology-mediated end joining, MMEJ) 是相对比较清楚的一种 aNHEJ^[3,7]。与 cNHEJ 相比, MMEJ 有三个特点。第一,可不依赖经典 NHEJ 修复蛋白,比如修复过程可不依赖 Ku,

又比如 Ligase III/I 替代 Ligase IV 执行连接。第二,修复结果含更多错误,如长片段删除,且产生更多的染色体异位^[84]。第三,依赖于短序列的同源性,这可由核酸酶切割或 Polμ 跨损伤修复产生,微同源性也是其不依赖经典 NHEJ 蛋白的结构基础^[1]。此外,HR 途径的经典蛋白 MRN 复合体及 CtIP (CtBP-interacting protein) 能促进 MMEJ^[7]。最初认为 MMEJ 为 cNHEJ 的补充形式且仅在缺失 cNHEJ 时进行,随后发现 MMEJ 能以较低比例与 cNHEJ 同时存在^[85]。关于 MMEJ 只是 NHEJ 的一种特殊形式,还是独立于 cNHEJ 的新途径,目前还存在争议。

6 NHEJ的进化

由于大肠杆菌无法重新连接线性化的质粒,最初认为原核生物不存在 NHEJ^[2]。但随后在细菌基因组中发现 Ku 的同源基因,暗示了 NHEJ 的存在^[86]。Ku 在细菌中的同源蛋白也是环状的异源二聚体结构^[87]。细菌中依赖 ATP 的连接酶称为 LigD, 包含一个聚合酶结构域、一个磷酸酯酶结构域及一个连接酶结构域^[88]。繁殖迅速的细菌因为复制基因组的存在而通常采取 HR 修复, NHEJ 则多存在于细胞静息周期长的特别是能产生芽孢的细菌中^[1]。酵母相对于哺乳动物更多地采用 HR 修复, NHEJ 所占比例较小^[1]。酵母的 NHEJ 系统不存在 DNA-PKcs 及 Artemis, 出芽酵母中的 MRX 复合体 (Mre11-Rad50-Xrs2, 对应哺乳动物 MRN) 协助 Ku 及 Ligase IV 进行 NHEJ^[3]。酵母中很少连接平末端,而是更多地依赖末端微同源性进行修复,且同样存在 aNHEJ^[89]。

7 NHEJ与HR

由于本系列中有文章专门对此进行讨论,这里只作简要介绍。HR 修复精确,但进行的门槛高(存在相同染色体), NHEJ 修复易错,相对于 HR 容易发生且修复范围广(底物灵活)。对二者的调控可分为三个层面。第一,细胞类型层面:不分裂的细胞(G0 期)不存在复制的染色体,所以 NHEJ 是唯一选择,而减数分裂细胞中的 DSB 可能仅由 HR 修复^[1,90];第二,细胞周期层面:最近发现 53BP1 (p53-binding protein 1)-Rif1 (Rap1-interacting factor 1) 与 Brca1 (Breast cancer 1)-CtIP 相互拮抗,组成依赖于细胞周期的调节回路,分别在 G1 期和 S/G2 期将修复导向 NHEJ 和 HR^[91]。第三,底物竞争层面:

Ku 与 MRN 能竞争性结合 DSB 末端, Ligase IV 复合体可抑制 HR 发生所必需的末端切割^[81,92]。此外,二者还存在协作,上文提到 Ligase IV 尝试连接失败后,可由 MRN 将修复导向 HR,结果将 G1 期的损伤积累至 S/G2 期修复^[8,81]。两种途径分工合作,共同维护基因组的稳定性。

8 讨论及研究展望

8.1 修复途径的交叉

底物的重叠、酶的重叠说明 NHEJ 与 BER、SSBR 及 aNHEJ 存在广泛的交叉^[6]。这使相同的末端结构存在多种修复方式,也增加了修复方式及连接产物的不确定性。这些途径可能具有互相补充的功能,能在一种途径无法正常进行的情况下选择其他途径,也可能仅仅是功能冗余。相同底物结构下如何在不同修复途径中做出选择,途径交叉能否作为进化上的选择优势,这些问题还有待进一步研究。

8.2 修复蛋白的多功能性

末端加工蛋白多具有双重甚至多重功能,如 Artemis (内切酶和外切酶)、Metnase (内切酶和甲基转移酶) 和 PNKP (激酶和磷酸化酶)。两种功能之间是否互相排斥或合作? 这可能是染色体异位的随机结果,但这种组合的选择优势还不清楚。

8.3 V(D)J重组/CSR系统

一方面,这是研究 NHEJ 的强大系统。NHEJ 缺陷可造成免疫缺陷,所以对免疫缺陷小鼠或患者进行遗传分析可以鉴定出 NHEJ 中的新蛋白质,Artemis、XLF 就通过这种方法被发现^[47,93]。明确的断裂位点还提供了一个研究同一底物条件下产物多样性的体内系统^[1]。基于 V(D)J 重组原理设计的 V(D)J 重组质粒系统则可帮助确认特定蛋白在 NHEJ 中的作用^[94]。另一方面,对 NHEJ 的研究将有助于理解相关免疫缺陷以及淋巴瘤的发生机制,研究开发新的治疗手段。通过恢复病变细胞正常 NHEJ 功能克服免疫缺陷,通过阻断癌细胞的 NHEJ 杀死癌细胞以清除淋巴瘤。

8.4 修复网络的构建

在酵母中,已有根据大规模双基因敲除菌株的耐药性确定基因间两两相互作用并构建 DNA 损伤应答 (DNA damage response, DDR) 及修复网络的研究^[95]。类似地,在人细胞中也有通过大规模小 RNA 干扰 (siRNA) 敲低已知 DDR 基因,并检测双敲除细胞的 IR 敏感性来确定两个蛋白质的互作并最终构建 DDR 网络的研究^[96]。更多的筛选还在进

行。此外,修复网络还可通过高通量的蛋白质互作 (酵母双杂交、免疫共沉淀) 实验构建。随着高通量筛选效率的增加及成本的降低,结合现有的实验及临床数据进行生物信息分析,将加快完善不同损伤刺激下 DDR 及修复网络的构建。

8.5 其他问题

DNA-PKcs 对 NHEJ 核心蛋白磷酸化的作用是什么? DDR 与 NHEJ 修复是如何联系的? 如何判断一段序列是 NHEJ 的精确修复产物还是未经历 DSB 损伤? 核小体、染色质行为如何促进或抑制 NHEJ, 如何调控 DNA 复制、转录及修复过程以避免互相干扰? 不同染色体间的 DSB 在什么情况下互相连接在一起? 这些都是值得探究的问题。

[参 考 文 献]

- [1] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211
- [2] Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair: Amst*, 2006, 5(9-10): 1042-8
- [3] Lieber MR, Wilson TE. SnapShot: nonhomologous DNA end joining (NHEJ). *Cell*, 2010, 142(3): 496-496.e1
- [4] Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204
- [5] Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, et al. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 35897-902
- [6] Strande NT, Waters CA, Ramsden DA. Resolution of complex ends by nonhomologous end joining-better to be lucky than good? *Genome Integr*, 2012, 3(1): 10
- [7] Deriano L, Roth DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet*, 2013, 47: 433-55
- [8] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247-71
- [9] Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Noordermeer SM, et al. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science*, 2014, 344(6180): 189-93
- [10] Davis AJ, Chen BP, Chen DJ. DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair: Amst*, 2014, 17: 21-9
- [11] Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006, 124(2): 301-13
- [12] Waters CA, Strande NT, Wyatt DW, et al. Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair: Amst*, 2014, 17: 39-51
- [13] Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al. Characterization

- of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest*, 1981, 68(3): 611-20
- [14] Mimori T, Hardin JA, Steitz JA. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem*, 1986, 261(5): 2274-8
- [15] Cary RB, Peterson SR, Wang J, et al. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4267-72
- [16] Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 2001, 412(6847): 607-14
- [17] Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5): 367-78
- [18] Shao Z, Davis AJ, Fattah KR, et al. Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair: Amst*, 2012, 11(3): 310-6
- [19] Britton S, Coates J, Jackson SP. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol*, 2013, 202(3): 579-95
- [20] Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J*, 1997, 16(16): 5098-112
- [21] DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, et al. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 2002, 21(12): 3192-200
- [22] Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, et al. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 675-82
- [23] Sun J, Lee KJ, Davis AJ, et al. Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *J Biol Chem*, 2012, 287(7): 4936-45
- [24] Roberts SA, Strande N, Burkhalter MD, et al. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, 2010, 464(7292): 1214-7
- [25] Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, et al. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature*, 1996, 382(6591): 551-5
- [26] Manis JP, Gu Y, Lansford R, et al. Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med*, 1998, 187(12): 2081-9
- [27] Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: Lessons from animal models. *Oncogene*, 2001, 20(40): 5572-9
- [28] Hammarsten O, Chu G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(2): 525-30
- [29] Leuther KK, Hammarsten O, Kornberg RD, et al. Structure of DNA-dependent protein kinase: Implications for its regulation by DNA. *EMBO J*, 1999, 18(5): 1114-23
- [30] Williams DR, Lee KJ, Shi J, et al. Cryo-EM structure of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at subnanometer resolution reveals α helices and insight into DNA binding. *Structure*, 2008, 16(3): 468-77
- [31] Sibanda BL, Chirgadze DY, Blundell TL. Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature*, 2010, 463(7277): 118-21
- [32] Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 1993, 72(1): 131-42
- [33] Rivera-Calzada A, Maman JD, Spagnolo L, et al. Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure*, 2005, 13(2): 243-55
- [34] Rivera-Calzada A, Spagnolo L, Pearl LH, et al. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO Rep*, 2007, 8(1): 56-62
- [35] Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, et al. The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(24): 7238-46
- [36] Kusumoto-Matsuo R, Ghosh D, Karmakar P, et al. Serines 440 and 467 in the Werner syndrome protein are phosphorylated by DNA-PK and affects its dynamics in response to DNA double strand breaks. *Aging: Albany NY*, 2014, 6(1): 70-81
- [37] Chan DW, Chen BP, Prithivirajsingh S, et al. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*, 2002, 16(18): 2333-8
- [38] Ding Q, Reddy YV, Wang W, et al. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(16): 5836-48
- [39] Yajima H, Lee KJ, Chen BP. ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7520-8
- [40] Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6582-7
- [41] Uematsu N, Weterings E, Yano K, et al. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 2007, 177(2): 219-29
- [42] Hammel M, Yu Y, Mahaney BL, et al. Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol Chem*, 2010, 285(2): 1414-23
- [43] Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, et al. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 2002, 108(6): 781-94
- [44] Sibanda BL, Critchlow SE, Begun J, et al. Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat Struct*

- Biol, 2001, 8(12): 1015-9
- [45] Grawunder U, Wilm M, Wu X, et al. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 1997, 388(6641): 492-5
- [46] Gu J, Lu H, Tiffin B, et al. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J*, 2007, 26(4): 1010-23
- [47] Buck D, Malivert L, de Chasseval R, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 2006, 124(2): 287-99
- [48] Fattah FJ, Kweon J, Wang Y, et al. A role for XLF in DNA repair and recombination in human somatic cells. *DNA Repair: Amst*, 2014, 15: 39-53
- [49] Riballo E, Woodbine L, Stiff T, et al. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): 482-92
- [50] Lu H, Pannicke U, Schwarz K, et al. Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4:DNA ligase IV activity. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11155-62
- [51] Tsai CJ, Kim SA, Chu G. Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 7851-6
- [52] Wu Q, Ochi T, Matak-Vinkovic D, et al. Non-homologous end-joining partners in a helical dance: structural studies of XLF-XRCC4 interactions. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(5): 1387-92
- [53] Andres SN, Vergnes A, Ristic D, et al. A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(4): 1868-78
- [54] Hammel M, Rey M, Yu Y, et al. XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32638-50
- [55] Hammel M, Yu Y, Fang S, et al. XLF regulates filament architecture of the XRCC4-ligase IV complex. *Structure*, 2010, 18(11): 1431-42
- [56] Ochi T, Wu Q, Blundell TL. The spatial organization of non-homologous end joining: from bridging to end joining. *DNA Repair: Amst*, 2014, 17: 98-109
- [57] Roy S, Andres SN, Vergnes A, et al. XRCC4's interaction with XLF is required for coding (but not signal) end joining. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(4): 1684-94
- [58] Ochi T, Wu Q, Chirgadze DY, et al. Structural insights into the role of domain flexibility in human DNA ligase IV. *Structure*, 2012, 20(7): 1212-22
- [59] Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, et al. Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *J Mol Biol*, 2003, 334(2): 215-28
- [60] Koch CA, Agyei R, Galicia S, et al. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J*, 2004, 23(19): 3874-85
- [61] Loizou JI, El-Khamisy SF, Zlatanou A, et al. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell*, 2004, 117(1): 17-28
- [62] Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, et al. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, 2006, 443(7112): 713-6
- [63] Bernstein NK, Williams RS, Rakovszky ML, et al. The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Mol Cell*, 2005, 17(5): 657-70
- [64] Kanno S, Kuzuoka H, Sasao S, et al. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J*, 2007, 26(8): 2094-103
- [65] Di Noia JM, Williams GT, Chan DT, et al. Dependence of antibody gene diversification on uracil excision. *J Exp Med*, 2007, 204(13): 3209-19
- [66] Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(6): 430-40
- [67] Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(5): 338-50
- [68] Yang SW, Burgin AJ, Huizenga BN, et al. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11534-9
- [69] Cortes LF, El KS, Zuma MC, et al. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*, 2009, 461(7264): 674-8
- [70] Zhou T, Akopiants K, Mohapatra S, et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase and the repair of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double-strand breaks. *DNA Repair: Amst*, 2009, 8(8): 901-11
- [71] Povirk LF, Zhou T, Zhou R, et al. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J Biol Chem*, 2007, 282(6): 3547-58
- [72] Mohapatra S, Yannone SM, Lee SH, et al. Trimming of damaged 3' overhangs of DNA double-strand breaks by the Metnase and Artemis endonucleases. *DNA Repair: Amst*, 2013, 12(6): 422-32
- [73] Orren DK, Machwe A, Karmakar P, et al. A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): 1926-34
- [74] Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 1998, 1(7): 969-79
- [75] Yamtich J, Sweasy JB. DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(5): 1136-50
- [76] Davis BJ, Havener JM, Ramsden DA. End-bridging is required for pol μ to efficiently promote repair of noncomplementary ends by nonhomologous end joining. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(9): 3085-94
- [77] Nick MS, Havener JM, Garcia-Diaz M, et al. A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*, 2005, 19(3): 357-66

- [78] Lee JW, Blanco L, Zhou T, et al. Implication of DNA polymerase λ in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem*, 2004, 279(1): 805-11
- [79] Mahajan KN, Gangi-Peterson L, Sorscher DH, et al. Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 13926-31
- [80] Ma Y, Lu H, Schwarz K, et al. Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle*, 2005, 4(9): 1193-200
- [81] Langerak P, Mejia-Ramirez E, Limbo O, et al. Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet*, 2011, 7(9): e1002271
- [82] Xu Z, Zan H, Pone EJ, et al. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(7): 517-31
- [83] Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 261-92
- [84] Yan CT, Boboila C, Souza EK, et al. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, 2007, 449(7161): 478-82
- [85] Corneo B, Wendland RL, Deriano L, et al. Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature*, 2007, 449(7161): 483-6
- [86] Aravind L, Koonin EV. Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res*, 2001, 11(8): 1365-74
- [87] Weller GR, Kysela B, Roy R, et al. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, 2002, 297(5587): 1686-9
- [88] Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11): 852-61
- [89] Daley JM, Palmbo PL, Wu D, et al. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 31-51
- [90] Zickler D, Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 603-754
- [91] Escribano-Diaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, et al. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 872-83
- [92] Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, et al. Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(7): 639-46
- [93] Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 2001, 105(2): 177-86
- [94] Hesse JE, Lieber MR, Gellert M, et al. Extrachromosomal DNA substrates in pre-B cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. *Cell*, 1987, 49(6): 775-83
- [95] Bandyopadhyay S, Mehta M, Kuo D, et al. Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science*, 2010, 330(6009): 1385-9
- [96] Cotta-Ramusino C, McDonald ER, Hurov K, et al. A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. *Science*, 2011, 332(6035): 1313-7