



论文

组蛋白 H2B 单泛素化参与 DNA 损伤修复的调控机制

曾鸣, 郭莲娣, 王鑫, 杨娟, 王思, 汪小波, 翁育丁, 刘聪*

四川大学华西第二医院, 成都 610041

* 联系人, E-mail: lcmicro@yahoo.com

收稿日期: 2013-11-01; 接受日期: 2014-03-27

国家自然科学基金(批准号: 31171319)资助项目

doi: 10.1360/N052013-00076

摘要 作为一种重要的组蛋白修饰形式, H2B 的单泛素化(uH2B)广泛地参与 DNA 复制、基因的表达与转录、DNA 损伤修复及异染色质维持等生物学事件. 在裂殖酵母中, H2B 的单泛素化发生在其羧基端的 119 位赖氨酸(K119), 并依赖于 Rhp6/Bre1 泛素连接酶复合体. 研究表明, uH2B 通过破坏 H2A/H2B 二聚体的结构促进 mRNA 在转录过程中的延伸, 同时促进 H3K4 的三甲基化激活基因的表达及参与 DNA 损伤修复. 本研究发现, Rhp6 能够对核糖核苷酸还原酶抑制基因(*Spd1*)位点进行活跃的染色质修饰, 促进 H2B 的单泛素化并抑制基因表达, 从而促进 dNTP 的合成并调控 DNA 复制及损伤修复. 重要的是, 本研究发现, 该过程不依赖于 H3K4 而决定于 H3K9 的三甲基化. 同时 uH2B 直接在 DNA 双链断裂位点富集, 通过改变染色质的结构参与 DNA 损伤修复, 该过程中可能存在其他更为复杂的分子机制.

关键词

DNA 修复

DNA 双链断裂

H2B 单泛素化

Spd1

RNR

当细胞受到内源性或外源性的 DNA 损伤之后, 细胞周期检验点会迅速激活, 使细胞周期停滞以完成修复, 这依赖于 2 个重要的激酶 ATR(ATM-Rad3-related)和 ATM(ataxia telangiectasia-mutated)^[1,2]. 在裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中, ATM 的同源蛋白 Tel1 只在 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)修复过程中 DNA 末端处理出现缺陷时才会参与细胞周期检验点的激活, 而大部分的细胞周期检验点信号的活化都依赖于 ATR 同源蛋白 Rad3^[3]. 已知的 DNA 损伤中, DNA 双链断裂是最为严重的一种. 在芽殖酵母中, 一个 DNA 双链断裂就会导致细胞周期检验点的激活^[4]. 在真核生物细胞中, DSB 修复的

机制是高度保守的, 主要分为快速但低保真性的非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)和速度慢但高保真性的同源重组(homologous recombination, HR), 前者在 KU70/KU80 结合 DNA 断裂末端后在 DNAPK 复合物等的处理下使断裂的 DNA 末端在空间上靠近, 再通过 DNA 连接酶 4 及 XRCC4 等一系列的修复蛋白作用直接将断裂的双链 DNA 连接起来^[5], 而后者则需要通过 MRN (Mre11-Rad50-NBS1)复合物、CTIP 以及一系列的核酸酶对 DNA 双链断裂末端进行加工形成单链 DNA(ssDNA)以侵入同源染色体的同源序列进行同源重组修复^[6].

引用格式: 曾鸣, 郭莲娣, 王鑫, 等. 组蛋白 H2B 单泛素化参与 DNA 损伤修复的调控机制. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 702-710

Zeng M, Guo L D, Wang X, et al. Regulation of DNA repair by mono-ubiquitination of H2B. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 702-710, doi: 10.1360/N052013-00076

近年的研究提出, 组蛋白的修饰在 DSB 的修复中发挥着重要的作用. 在 DNA 损伤位点附近组蛋白会进行一系列的修饰和构象上的变化, 如 DNA 断裂位点产生后, 附近染色质上的组蛋白 H2A 的羧基端会迅速进行磷酸化, 从而募集 MDC1 以及随后的 53BP1 和 BRCA1 到 DNA 双链断裂位点^[7,8]. 同时 H2A.Z 也会在 DSB 附近富集, 这对 H4 的乙酰化是必需的^[9]. 在出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, H2B 第 123 位赖氨酸的泛素化对 DSB 修复也有重要作用, 它促进 DSB 位点 H3K4, H3K36, H3K79 的甲基化, 这些修饰对损伤的快速修复至关重要^[10-12], 例如, 在 Set1 缺陷的细胞中, H3K4 甲基化程度过低, 导致 NHEJ 不能正常进行^[13]. 在裂殖酵母中, 依赖于 HULC 复合物的 H2B 单泛素化对于异染色质的维持起着极其重要的作用^[14]. 在高等哺乳动物细胞内, DNA 双链断裂产生后, 在激酶 ATM 的作用下, uH2B 在 DSB 位点富集, 并募集其他修复蛋白如 Rad51, KU70/KU80, 以完成 HRR(homologous recombination repair)或 NHEJ, 这个过程依赖于 RNF20/RNF40 复合物^[15]. 同时, uH2B 和 uH2A 的去泛素化对维持遗传信息的稳定也很重要. Nicassio 等人^[16]指出, 在 USP3 缺陷的细胞中, uH2B 和 uH2A 不能正常地去泛素化, 导致基因组的不稳定性. 此外, 组蛋白的修饰在基因表达、转录调控过程中也发挥重要的作用. 例如, 裂殖酵母中单泛素化的 H2B 通过破坏 H2A/H2B 的二聚体结构, 促进核小体的解离从而有助于 mRNA 在转录区域的延伸, 以达到调节基因转录的目的^[17], 同时 H2B 的单泛素化促进大多数启动子区域依赖于 Set1 的 H3K4 的甲基化, 从而促进蛋白的表达^[18].

为进一步认识组蛋白修饰在 DNA 损伤应答过程中的功能, 通过免疫印迹的方法筛选 20 余种组蛋白修饰在离子射线照射后的活化情况, 发现裂殖酵母 H2B 的 K119 位点的单泛素化修饰(uH2B)出现明显的增强, 在 H2B 泛素化位点突变的菌株(*htb1-K119R* 菌株, 其中 *htb1* 为裂殖酵母中 H2B 的基因名)中, 这种动态变化的缺失导致同源重组修复因子向损伤位点的招募受到抑制. 染色质免疫共沉淀结果显示, DNA 损伤发生后, uH2B 在 DNA 双链断裂位点呈现快速富集, 提示 H2B 泛素化在 DSB 修复中发挥直接的生化功能. 此外, 本研究还发现, uH2B 富集在 *Spd1* 基因位点并抑制其基因表达, 同时影响 H3K9 的甲基化. 在 H2B 泛素化缺陷的菌株(*htb1-K119R*)中, Spd1 蛋白

持续的高水平, 导致核糖核酸还原酶(ribonucleotide reductase, RNR)功能紊乱和 dNTP 合成不足, 从而造成 DNA 复制及损伤修复过程中的生理缺陷.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用的裂殖酵母菌株见表 1. 酵母生长所需的培养基的配方以及基本实验方法来自于 Forsburg 实验室^[19]. 所使用的引物见表 2.

1.2 蛋白抽提

将酵母细胞培养至对数生长期. 收集 10 A₆₀₀ 细胞, 洗去培养基并重悬于 100 μL 水中. 加入 100 μL 0.7 mol/L NaOH, 混匀后室温处理 10 min. 加入 400 μL 20%三氯乙酸沉淀蛋白, 21000×g 离心 10 min, 将沉淀溶解于十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)样品缓冲液中^[20]. 利用 Westernbolt 检测, 各种组蛋白修饰抗体购自 Millipore(美国), HA 抗体购自

表 1 本研究所使用的裂殖酵母菌株

名称	基因型
SP501	<i>ade6-704, leu1-32, ura4D-18, his3-D1</i>
SP792	<i>rad52-GFP-TAP:kana, leu1-32 his3-D1</i>
SP801	<i>TAP-suc22::kana, leu1-32 his3-D1</i>
SP806	<i>Spd1-HA::kana, leu1-32 his3-D1</i>
SP864	<i>Spd1::hygro, ade6-704, leu1-32, ura4D-18, his3-D1</i>
SP897	<i>htb1-K119R-3flag::kana, ade6-704, leu1-32, his3-D1</i>
SP962	<i>rhp6-TAP::kana, ade6-704, leu1-32, ura4D-18, his3-D1</i>
SP1026	<i>rhp6::kana, ade6-704, leu1-32, ura4D-18, his3-D1</i>
YY4138	<i>leu1-32 ura4-D18 his3-D1 arg3::HO 位点(kanMX6) ars1::nmt-HO 内切酶:ampR:his3+:ars1</i>

表 2 本研究所使用的引物

名称	引物序列(5'→3')
引物 1	TTGTCCTTCATGGCACG CAACTGCTTTCAAGGTAACA
引物 2	ACAGCAGCAAGCGAGTTA AAAGCGGTGGGTTATAGG
引物 3	GAATGCGGGTTCGTAAATC CGTCAAACGGCTTCAACCA
引物 4	CGTACTAGCTTGTTTGAACCTGAACCTAGTG CCGATATCTAGTTCTCTCTCAGACTGCGAG
引物 5	TAGCACCGGCTCGTCTATTT AAGCAATGGGACTTCAATCG
引物 6	TCAAAGCTGCGAAACAACAC TCGGTGACGACGATCAATAA

Roche(11815016001, 瑞士).

1.3 梯度稀释打点分析

将酵母细胞培养至对数生长期, 计数 2×10^6 细胞并重悬于 100 μL 水中, 10 倍梯度稀释后, 依次取 5 μL 菌液接种于不同药物处理的培养盘上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 天, 进行图像采集.

1.4 RNA 提取及 qPCR 分析

将酵母细胞培养至对数生长期, 收集 50 A_{600} 细胞, 洗去培养基并重悬于 40 μL AE 缓冲液(50 mmol/L 醋酸钠; 10 mmol/L EDTA; pH 5.3)中, 加入 40 μL 10%SDS, 震荡混匀. 加入等体积的苯酚, 震荡混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 min. 在冰水浴中迅速冷却后 21000 $\times g$ 离心 2 min. 取上层液体至新的离心管中, 用苯酚/氯仿萃取 2 次, 得到的水相加入醋酸钠(pH 5.3, 至终浓度 0.3 mol/L)和 2.5 倍体积的无水乙醇, 冰上静置 10 min. 21000 $\times g$ 离心 10 min, 沉淀用 70%乙醇洗 2 次后溶于 20 μL 水中.

采用 Promega 逆转录试剂盒(M170A, 美国)将 RNA 逆转录为 cDNA. 一步法水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 得到 cDNA, 采用 Promega qPCR 试剂盒及 Bio-Rad CFX96 荧光定量系统(美国)进行荧光定量实验.

1.5 染色质免疫共沉淀(ChIP)

HO 核酸酶诱导 DSB 系统由 Paul Russell 实验室惠赠, 通过 nmt40 启动子诱导 HO 的表达并产生 DSB, 在 HO 诱导后分不同时间段取样^[21]. 收集 50 A_{600} 细胞于终浓度 1% 的甲醛中交联 15 min, 加入 2.5 mol/L 甘氨酸终止交联, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗后重悬于 400 μL ChIP (chromatin immunoprecipitation)裂解液(50 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid, HEPES), pH 7.4; 140 mmol/L NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% 脱氧胆酸钠(Na deoxycholate); 蛋白酶抑制剂)中, 加入 1 μL 蛋白酶抑制剂 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐(4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, AEBSF), 利用玻璃珠破碎细胞, 离心后将沉淀于 1 mL ChIP 裂解液中洗涤 1 次, 重悬于 400 μL ChIP 裂解液中, 超声打断 DNA 于 500 bp 左右, 离心弃去沉淀, 取 5 μL 上清作为对照(input), 加入抗体孵育 1 h 后加入 Protein G Dyna beads

(Invitrogen, 美国)过夜. 依次用 ChIP 裂解液、ChIP 裂解液(高盐)(50 mmol/L HEPES pH 7.4; 500 mmol/L NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% 脱氧胆酸钠)、ChIP 洗脱液(10 mmol/L Tris, pH 8.0; 250 mmol/L LiCl; 0.5% NP-40; 0.5% 脱氧胆酸钠; 1 mmol/L EDTA)和 Tris-EDTA 缓冲液洗涤磁珠 2 次后加入 ChIP 洗脱液(50 mmol/L Tris, pH 8.0; 1% SDS; 10 mmol/L EDTA)于 65 $^{\circ}\text{C}$ 逆交联, 得到的液体采用 Omega DNA 纯化试剂盒(美国)纯化回收于 100 μL 水中, 取 5 μL 进行定量分析.

1.6 微球菌核酸酶(MNase)酶切实验

将酵母细胞培养至对数生长期, 收集 10 A_{600} 细胞, 洗去培养基并重悬于 100 μL CSE 缓冲液中 (20 mmol/L 柠檬酸钠(citrate)-磷酸缓冲液(phosphate), pH 5.6; 40 mmol/L EDTA; 1.2 mol/L 山梨糖醇), 加入溶细胞酶(zymolyase)至终浓度 0.2 mg/mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 离心并重悬于 100 μL 消化液中, 加入 MNase 至终浓度 1 U/ μL , 室温酶切 5, 20 和 40 min 后加入 EDTA 终止反应. 采用 Roche 核酸纯化试剂盒回收 DNA, 于 4% 琼脂糖凝胶中电泳 4 h(2 V/cm)后采集图像.

1.7 免疫荧光染色

将收集的细胞于 70%乙醇中室温固定 5 min, 离心并洗涤细胞 1 次, 重悬于含有 10% 血清的 PBS 缓冲液中封闭 1 h. 离心弃上清, 将细胞重悬于用 10% 血清/PBS 以 1:100 稀释的 TAP 一抗中, 室温孵育过夜. 离心弃上清, PBS 洗涤细胞 2 次后重悬于用 10% 血清/PBS 以 1:300 稀释的带 CY3 标记的二抗中, 室温孵育 2 h. 离心弃上清, PBS 洗涤细胞 2 次后制片, 荧光显微镜下观察.

2 结果与分析

2.1 H2B 泛素化在射线照射后明显增强

组蛋白修饰在 DNA 损伤修复中具有重要功能, 为了发现新的组蛋白修饰参与 DNA 损伤修复的信号通路, 利用蛋白免疫印迹技术, 筛选了 20 余种组蛋白在粒子射线(X-ray)处理后的应激反应, 发现 H2B-K119 位点的单泛素化在损伤之后大量富集(图

1A 和 B), 提示 H2B 在损伤位点的单泛素化可能对 DNA 的双链断裂修复有重要的作用. 由于相对于未修饰的组蛋白来说, 修饰的组蛋白只占了很小的一部分, 所以本研究未能用免疫印迹的方法检测到其他组蛋白位点在射线处理后出现明显的修饰波动(图 1A). 实际上, 本研究发现, 在高等哺乳动物细胞中, uH2A 在粒子射线处理后增强明显, 同时免疫荧光表明其与 H2Ax 磷酸化共定位, 提示 uH2A 在 DSB 修复中的重要功能, 但在酵母中未有类似的报道, 可能有其他的调控机制. 同时, 在羟基脲(hydroxyurea, HU)和甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)处理下, H2B 的单泛素化也明显增强, 提示了 uH2B 在 DNA 复制中的重要功能(图 1B). H2B 的单泛素化依赖于泛素化酶 Rhp6, *Rhp6* 基因缺失或赖氨酸 119 位点突变为精氨酸(*htb1-K119R*), H2B 便完全不能被泛素化^[22,23]. 打点实验表明, *htb1-K119R* 菌株对基因毒物 HU 和 MMS 高度敏感, 存活率下降(图 2C), 表明 uH2B 在 DNA 复制和 DNA 损伤修复中发挥重要的作用.

2.2 H2B 泛素化影响 *Spd1* 基因表达和 RNR 调控

既然 uH2B 同时影响基因的转录和 DNA 的复制及修复, 本研究猜想, 其是否能够通过调节某些参与 DNA 复制和修复的重要基因的表达或转录来影响复制和修复. 在其他工作中, 发现 H2B 泛素化功能与

RNR 调控有关. 在裂殖酵母中, DNA 复制及损伤修复所需要的 dNTP 原料依赖于核糖核苷酸还原酶(RNR), 该蛋白由 Cdc22 和 Suc22 两个亚基构成, 大亚基 Cdc22 定位于细胞质而小亚基 Suc22 位于细胞核内. 在 S 期或细胞受到 DNA 损伤之后, Suc22 被转运出核与 Cdc22 组合形成 RNR 全酶复合体, 为 DNA 复制或修复提供 dNTP^[24]. Suc22 的出核转运受到小蛋白 Spd1 的抑制, 在 S 期或 DNA 损伤后, Spd1 会被泛素连接酶 CUL4-DDB1-Cdt2 多泛素化, 随后被 26S 蛋白酶体所降解, 从而刺激 Suc22 运输到核外并参与 dNTP 的合成^[25-27]. 在 *Ddb1* 缺陷的细胞中, DNA 的复制减缓, 复制叉不稳定并出现 DSB 同源重组修复的缺陷^[28,29].

本研究发现, *htb1-K119R* 细胞中, Spd1 蛋白水平明显升高(图 2A). Spd1 蛋白水平的升高导致 Suc22 不能正常地出核形成 RNR 复合物以进行 dNTP 的合成(图 2B), 这可能是 uH2B 影响 DNA 复制和损伤修复的另一个重要原因. 在对 *Spd1* 的 mRNA 进行定量分析之后发现, 在 *htb1-K119R* 和 *rhp6-d* 细胞中, *Spd1* 的 mRNA 量明显高于正常细胞, 这说明 uH2B 通过影响 *Spd1* 的启动子活性或转录水平来抑制 Spd1 的蛋白水平(图 2C). 同时, 在 *htb1-K119R* 的菌株中将 *Spd1* 敲除, 能够很好地拯救其对基因毒物羟基脲(HU), 甲基磺酸甲酯(MMS)以及紫外线(ultraviolet, UV)的敏感度(图 2D), 进一步证实了 uH2B 能通过调控 *Spd1* 的表达调控 DNA 复制和损伤修复.

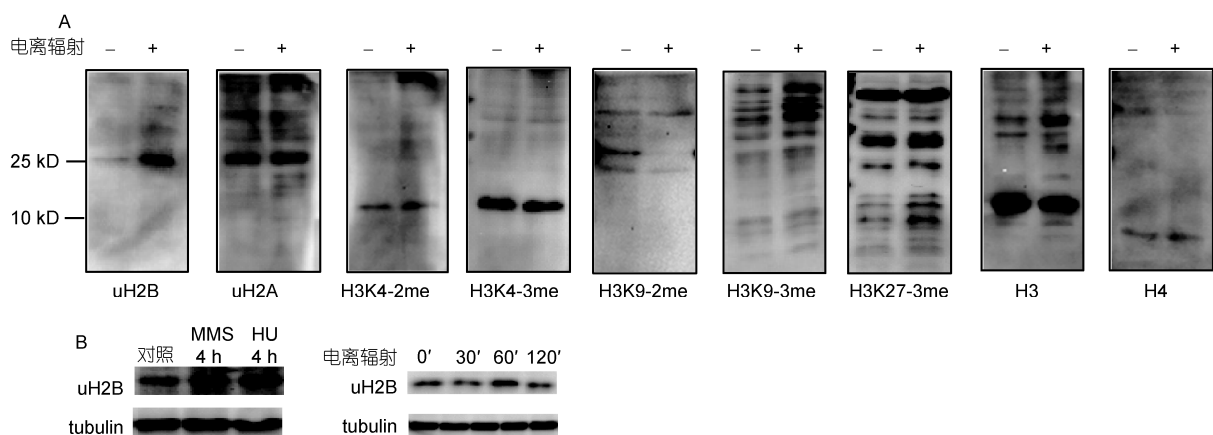


图 1 H2B 单泛素化参与 DNA 损伤应激

A: 野生型菌株在离子射线(X-ray: 40 Gy)照射后 1 h 收集样品, 碱裂解法抽提总蛋白, 蛋白免疫印迹检测多种组蛋白修饰的应激反应. 2me: 二甲基化; 3me: 三甲基化; B: 野生型菌株在基因毒物 MMS, HU 处理 4 h 后 uH2B 的活化情况, 以及在离子射线照射后的动态变化过程

2.3 Rhp6 结合在 *Spd1* 基因区域并通过泛素化 H2B 来调控 *Spd1* 的表达

为了阐明 uH2B 调节 *Spd1* 基因表达的具体过程及作用机制, 利用染色质免疫共沉淀的方法对 *Spd1* 基因位点进行了分析. 通过 3 个区域对 *Spd1* 基因进行分析: 启动子区域、可读框(open reading frame, ORF)的 5'端和 3'端(图 3A), 引物序列见表 2(引物 1, 2, 3). 为防止细胞周期改变的影响, 本研究通过 *cdc25* 温度敏感菌株将酵母细胞阻滞在 G2 期. 通过对 uH2B 在染色质上的分布, 发现 uH2B 在 *Spd1* 区域有明显的富集(图 3B), 表明 uH2B 对 *Spd1* 的表达有直接的调控作用. 重要的是, Rhp6 在 *Spd1* 区域也有明显的富集(图 3B), 提示 uH2B 对 *Spd1* 表达的影响来自于 Rhp6 在 *Spd1* 位点的定位, Rhp6 通过对该区域 H2B 的单泛素化来调节 *Spd1* 的表达, 但 Rhp6 在可读框的 3'端的定位很少, 而主要定位在启动子和可读框 5'区域, 可能 Rhp6 主要调节 *Spd1* 转录的启动, 而其转录的延伸可能受其他一些途径的调节. 有报道认为, uH2B 可以影响 H3K4 的甲基化^[10], 本研究进一步分析 uH2B 是否通过影响其他的组蛋白修饰来调控基因的表达. 在 *htb1-K119R* 菌株中测定了一系列的组蛋白修饰在

Spd1 位点的分布, 发现 H3K9 三甲基化(3me)不能正常地富集(图 3C), 而一般情况下, H3K9-3me 对基因的表达会造成表达沉默的效应, 这揭示了 uH2B 影响 *Spd1* 基因表达可能通过下调 H3K9-3me 的富集. 既然 dNTP 在 DNA 损伤修复中发挥重要的作用, 那么 uH2B 对 *Spd1* 转录的调控是否受到 DNA 损伤的影响? 通过 MMS 处理细胞后对 *Spd1* 区域的 uH2B 分布, 发现 uH2B 在 *Spd1* 基因区域的分布几乎没有改变, 说明 uH2B 对 *Spd1* 基因的转录的影响与 DNA 损伤无直接关系(图 3D), 提示 uH2B 通过调节 *Spd1* 的转录参与 DNA 损伤修复是一个间接的过程.

2.4 uH2B 直接在 DSB 区域富集并参与 DNA 损伤修复

为阐明 H2B 泛素化在 DNA 损伤修复过程中的作用, 利用离子射线处理 *htb1-K119R* 菌株观察同源重组调控蛋白 Rad52 的灶点(foci)形成情况. 实验表明, *htb1-K119R* 细胞中 Rad52-GFP 的 DSB 灶点形成明显滞后, 并随着时间延长而缓慢增高, 说明同源重组修复途径存在缺陷, 不能及时对 DNA 双链断裂进行修复^[30]; 而正常细胞则在 2 h 内完成对 Rad52 的募集并

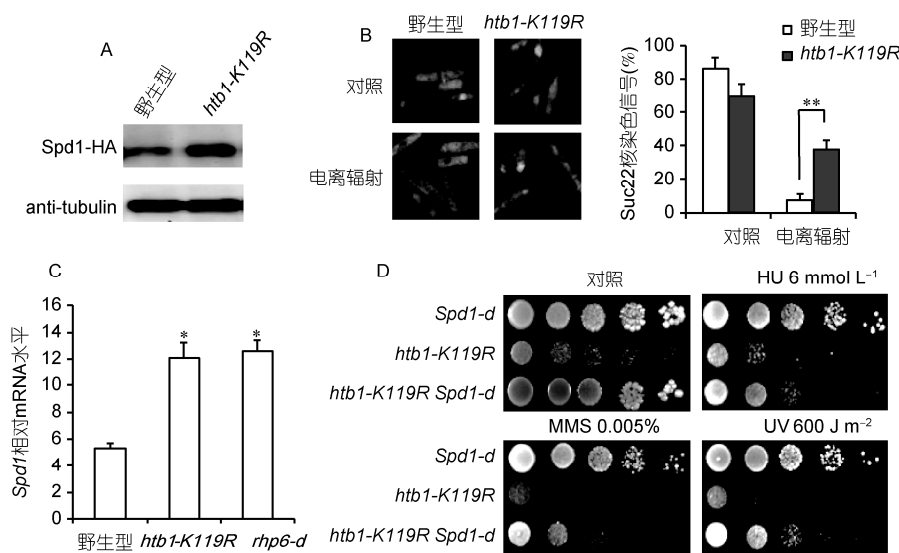


图 2 uH2B 通过抑制 *Spd1* 的表达调控 RNR 的活性

A: 蛋白免疫印迹技术分析野生型及 *htb1-K119R* 中 *Spd1*-HA 的蛋白水平. *Spd1* 蛋白水平在 *K119R* 菌株中显著增高; B: 免疫荧光分析野生型, *htb1-K119R* 及 *rhp6-d* 在电离辐射处理后 Suc22 出核转运的效率; C: 荧光定量 RT-qPCR 分析显示, *htb1-K119R* 及 *rhp6-d* 中 *Spd1* 的 mRNA 量较野生型中明显增高; D: 打点分析, *Spd1* 基因缺失可拯救 *htb1-K119R* 对基因毒物的高度敏感. 10 倍梯度稀释的细胞点在不同药物或射线处理的培养基上, 30℃ 培养 4 天后采集图像. 数据统计均采用 3 次独立的实验并对其进行统计学分析. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

能很快地完成修复过程(图 4A). Moss 等人^[29]指出, 在 DSB 同源修复时, 受损的 DNA 链侵入同源染色体的同源序列并以此为模板合成新的 DNA 片段的过程中需要 dNTP 的合成. 在 *Ddb1* 缺陷的菌株中, *Spd1* 不能及时被降解导致同源重组修复的缺陷. 而 uH2B 通过调节 *Spd1* 的表达影响 dNTP 的合成, 当 H2B 不能正常被泛素化时, *Spd1* 的蛋白水平过高是导致同源重组修复缺陷的一个重要因素, 这也是 uH2B 参与同源重组修复的一个重要途径. H2B 的泛素化是整个基因组范围内的事件, 它对 DNA 损伤修复的影响不仅是调节基因的表达, 也通过改变染色体的构象来实现, 松弛的染色体更有利于修复蛋白的募集及 DNA 结构的改变从而更容易地进行修复. H2B 泛素化的缺失导致染色体整体的浓缩, 利用微球菌核酸酶对基因组 DNA 进行酶切, *htb1-K119R* 细胞的染色质对核酸酶敏感度降低, 说明 H2B 泛素化缺陷的细胞存在染色质装配缺陷(图 4B). 染色质去浓缩是基因表达和 DNA 修复的重要调控途径, 本研究猜测, H2B 单泛素化有可能在 DNA 损伤位点上直接发生, 以调控染色质的浓缩程度, 进而促进下游修复蛋白因子在损伤位点的招募. 为了进一步证实这一点, 利用可诱导的定点 DSB 系统对 uH2B 在 DSB 位点附近的动态变化过程进行了分析^[21]. 在距离 DSB 位点 0.2, 5.4 和 9 kb(表 2, 引物 4, 5, 6)的位置, 随着 HO 诱导的 DNA 双链断裂的产生, uH2B 逐渐富集到 DSB 两

侧区域, 而在较近的 0.2 kb 位点, uH2B 出现较为明显的诱导再回复的动态变化过程, 提示 H2B 的泛素化随着修复的完成而消退(图 4D). 这些数据有力地证明了 uH2B 直接富集在 DSB 位点并参与 DNA 损伤修复.

3 讨论

由于组蛋白修饰在基因组范围内的广泛作用, 表观遗传学成为目前基因组学和蛋白质组学研究的前沿问题. H2B 的泛素化作为重要的一种组蛋白修饰, 在 DNA 复制与修复、基因表达及转录调控过程中起着至关重要的作用. 一般情况下认为, uH2B 通过促进 H3K4 的甲基化及转录的延伸以保证基因的表达^[31]; 而本研究发现, uH2B 在 *Spd1* 基因区域富集并抑制其基因表达, 以保证 DNA 的复制及修复. 最近的一些研究表明, uH2B 对转录的调节具有一定的选择性, 特别是对一些癌基因的抑制作用^[32], 这与 uH2B 抑制 *Spd1* 的表达是一致的, 有意思的是, 这个过程并不依赖于 uH2B 对 H3K4 甲基化的影响(图 3C), 而是通过降低 H3K9 的甲基化水平来实现. Foster 和 Downs^[33]指出, uH2B 对 H3K4 甲基化的影响并不是绝对的, 应该存在更加复杂的调节机制.

越来越多的研究表明, uH2B 参与 DNA 双链断裂的修复^[15], 但是机制尚不清晰, 而且没有直接证据表

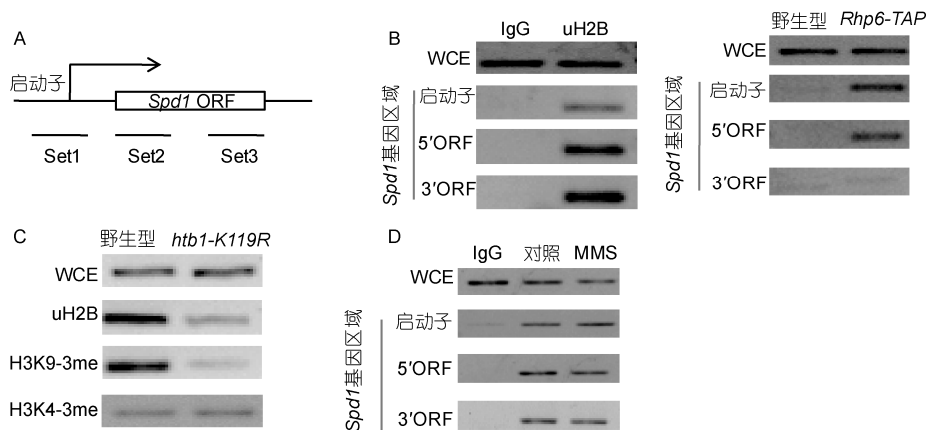


图 3 Rhp6 调控 *Spd1* 的表达

A: 染色质免疫共沉淀对 *Spd1* 基因区域进行分析, 其中 Set1 引物位于启动子序列, 而 Set2 和 Set3 位于可读框内; B: 染色质免疫共沉淀分析 uH2B 及 *Rhp6-TAP* 在 *Spd1* 基因区域的定位. WCE(whole cell extract): 全细胞提取物; C: 染色质免疫共沉淀分析野生型, *htb1-K119R* 中启动子位置 H3K9 和 H3K4 三甲基化的分布情况; D: 在 DNA 损伤的情况下(0.02% MMS, 4 h)染色质免疫共沉淀分析 uH2B 在 *Spd1* 基因区域的定位

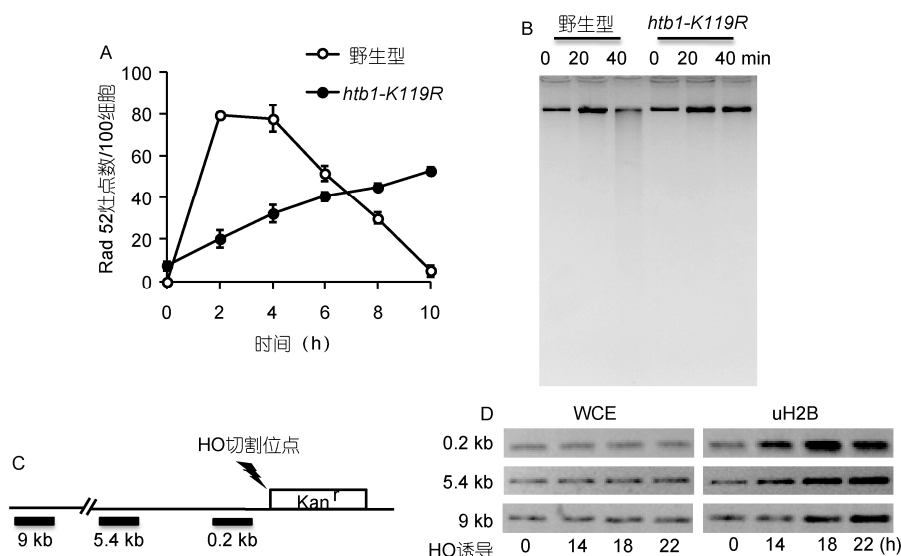


图4 uH2B 直接富集于 DSB 位点并参与 DNA 损伤修复

A: 在 Rad52-GFP 菌株中, 分析野生型和 *htb1-K119R* 在离子射线(40 Gy)处理后 Rad52 的 foci 形成情况; B: 微球菌核酸酶检测野生型和 *htb1-K119R* 的染色质敏感度。微球菌核酸酶处理 0, 20, 40 min 后终止反应, 提取细胞基因组 DNA, 于琼脂糖凝胶电泳检测染色质降解程度; C, D: 利用可诱导 DSB 的 HO 系统, 分析 H2B 在 DSB 附近的泛素化状态。在硫胺素诱导 HO 核酸酶表达 14, 18, 22 h 后收集细胞, 染色质免疫共沉淀分析位于 DSB 上游 0.2, 5.4 和 9 kb 位置 uH2B 的富集

明 uH2B 在损伤位点的直接富集。利用可诱导的定点 DSB 系统发现, uH2B 在 DSB 位点周围大量富集, 参与 DNA 双链断裂的修复, 但其具体的分子机制尚不清楚, 可能是通过改变核小体的构象使该区域的染色质松弛从而有利于修复蛋白的募集^[14,34], 或者是通过促进其他组蛋白修饰进行间接调控, 也可能是特异性地募集某些修复蛋白到损伤位点。研究发现, 在 DNA 双链断裂修复中, uH2B 缺陷可能导致同源重组修复蛋白 Rad51 及非同源黏性末端连接修复蛋白 KU70/KU80 向 DNA 损伤断裂位点的募集受到影响, 并迟滞 DNA 修复途径, 这与 *htb1-K119R* 细胞中 DNA 损伤修复的缺陷一致^[15]。

总之, 本研究阐述了 uH2B 参与 DNA 双链断裂修复的新途径和方式。uH2B 可富集在 *Spd1* 基因的区域并调节 *Spd1* 的基因表达以促进 dNTP 合成, 参与 DNA 复制及 DNA 双链断裂修复, 特别是同源重组修

复; 同时, uH2B 能直接富集于损伤位点, 调控染色质的构象或者其他的组蛋白修饰来参与 DNA 双链断裂的修复(图 5)。

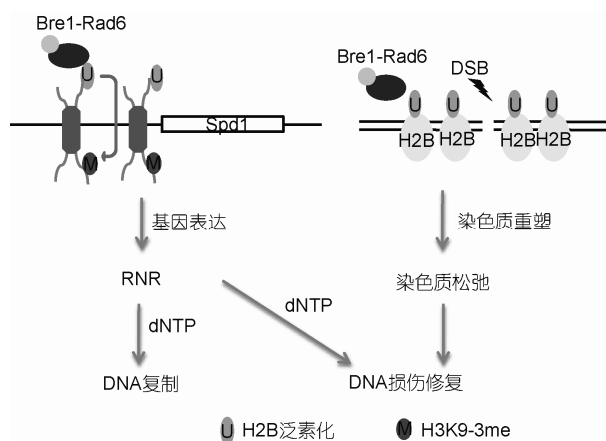


图5 uH2B 参与 DNA 损伤修复的模式图

参考文献

- 1 Derheimer F A, Kastan M B. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. FEBS Lett, 2010, 584: 3675-3681
- 2 Flynn R L, Zou L. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. Trends Biochem Sci, 2011, 36: 133-140
- 3 Limbo O, Porter-Goff M E, Rhind N, et al. Mre11 nuclease activity and Ctp1 regulate Chk1 activation by Rad3/ATR and Tel1/ATM

- checkpointkinases at double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 573–583
- 4 Sanchez Y, Zhou Z, Huang M, et al. Analysis of budding yeast kinases controlled by DNA damage. *Methods Enzymol*, 1997, 283: 398–410
 - 5 Aravind L, Koonin E V. 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: 1365–1374
 - 6 Lamarche B J, Orazio N I, Weitzman M D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett*, 2010, 584: 3682–3695
 - 7 Nakamura T M, Du L L, Redon C, et al. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 6215–6230
 - 8 Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak M J, et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 675–679
 - 9 Xu Y, Ayrapetov M K, Xu C, et al. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, 2012, 48: 723–733
 - 10 Sun Z W, Allis C D. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 2002, 418: 104–108
 - 11 Hwang W W, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu A G, et al. A conserved RING finger protein required for histone H2B mono-ubiquitination and cell size control. *Mol Cell*, 2003, 11: 261–266
 - 12 Wyce A, Xiao T, Whelan K A, et al. H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell*, 2007, 27: 275–288
 - 13 Faucher D, Wellinger R J. Methylated H3K4, a transcription-associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1001082
 - 14 Zofall M, Grewal S I. HULC, a histone H2B ubiquitinating complex, modulates heterochromatin independent of histone methylation in fission yeast. *J Biol Chem*, 2007, 282: 14065–14072
 - 15 Moyal L, Lerenthal Y, Gana-Weisz M, et al. Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 2011, 41: 529–542
 - 16 Nicassio F, Corrado N, Vissers J H, et al. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol*, 2007, 17: 1972–1977
 - 17 Weake V M, Workman J L. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*, 2008, 29: 653–663
 - 18 Racine A, Pagé V, Nagy S, et al. Histone H2B ubiquitylation promotes activity of the intact Set1 histone methyltransferase complex in fission yeast. *J Biol Chem*, 2012, 287: 19040–19047
 - 19 Forsburg S L, Rhind N. Basic methods for fission yeast. *Yeast*, 2006, 23: 173–183
 - 20 Vitaly V, Kushnirov. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 2000, 16: 857–860
 - 21 Du L L, Nakamura T M, Russell P. Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to doublestrand breaks. *Genes Dev*, 2006, 20: 1583–1596
 - 22 Maruyama T, Nakamura T, Hayashi T, et al. Histone H2B mutations in inner region affect ubiquitination, centromere function, silencing and chromosome segregation. *EMBO J*, 2006, 25: 2420–2431
 - 23 Robzyk K, Recht J, Osley M A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 2000, 287: 501–504
 - 24 Elledge S J, Zhou Z, Allen J B, et al. DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*, 1993, 15: 333–339
 - 25 Nestoras K, Mohammed A H, Schreurs A S, et al. Regulation of ribonucleotide reductase by Spd1 involves multiple mechanisms. *Genes Dev*, 2010, 24: 1145–1159
 - 26 Liu C, Poitelea M, Watson A, et al. Transactivation of *Schizosaccharomyces pombe* cdt²⁺ stimulates a Pcu4-Ddb1-CSN ubiquitin ligase. *EMBO J*, 2005, 24: 3940–3951
 - 27 Liu C, Powell K A, Mundt K, et al. Cop9/sinalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev*, 2003, 17: 1130–1140
 - 28 Bondar T, Mirkin E V, Ucker D S, et al. *Schizosaccharomyces pombe* Ddb1 is functionally linked to the replication checkpoint pathway. *J Biol Chem*, 2003, 278: 37006–37014
 - 29 Moss J, Tinline-Purvis H, Walker C A, et al. Break-induced ATR and Ddb1-Cul4^{Cdt2} ubiquitin ligase -dependent nucleotide synthesis promotes homologous recombination repair in fission yeast. *Genes Dev*, 2010, 24: 2705–2716
 - 30 Kim W J, Lee S, Park M S, et al. Rad22 protein, a rad52 homologue in *Schizosaccharomyces pombe*, binds to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 2000, 275: 35607–35611
 - 31 Kao C F, Hillyer C, Tsukuda T, et al. Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev*, 2004, 18: 184–195

- 32 Shema E, Tirosh I, Aylon Y, et al. The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression. *Genes Dev*, 2008, 22: 2664–2676
- 33 Foster E R, Downs J A. Methylation of H3 K4 and K79 is not strictly dependent on H2B K123 ubiquitylation. *J Cell Biol*, 2009, 184: 631–638
- 34 Goldstein M, Derheimer F A, Tait-Mulder J, et al. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16874–16879

Regulation of DNA Repair by Mono-Ubiquitination of H2B

ZENG Ming, GUO LianDi, WANG Xin, YANG Juan, WANG Si, WANG XiaoBo,
WENG YuDing & LIU Cong

West China Second University Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

As an important histone modification, mono-ubiquitination of H2B (uH2B) widely regulates a series of events, including DNA replication, gene expression and transcription, DNA repair and heterochromatin maintenance. In *Schizosaccharomyces pombe*, uH2B occurs at its C-terminal lysine 119 dependent on Rhp6/Bre1 complex. Research shows that uH2B activates gene expression and regulates DNA repair via stimulating methylation of H3K4 and promoting mRNA elongation through destroying H2A/H2B dimer. We demonstrate that localization of Rhp6 silences *spd1* by stimulating mono-ubiquitination of H2B at *spd1* region and promoting dNTP synthesis to regulate DNA replication and DNA repair. Importantly, it depends on trimethylation of H3K9 instead of H3H4. Besides, enrichment of uH2B at double strand break site plays an important role in DNA repair through regulating chromatin structure, but the mechanism remains unclear.

DNA repair, DNA double strand break, H2B mono-ubiquitination, *Spd1*, RNR

doi: 10.1360/N052013-00076