



乙酰化修饰降低 Ku 蛋白的 DNA 结合活性

周盈^{1,2}, 毕利军^{2*}

¹ 佛山科学技术学院, 广东 佛山 528000

² 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

摘要:【目的】研究乙酰化修饰对 Ku 蛋白活性的影响。【方法】利用耻垢分枝杆菌为表达菌株, 转入 Ku 蛋白表达质粒, 纯化具有乙酰化修饰的 Ku 蛋白和无乙酰化的 Ku 蛋白突变体, 比较两类蛋白的生化活性; 分析氧化压力和酸性环境下耻垢分枝杆菌细胞内 Ku 蛋白乙酰化水平的变化。【结果】Ku 蛋白过量表达的耻垢分枝杆菌比转入空质粒的对照菌株生长缓慢; 乙酰化 Ku 蛋白比未发生乙酰化 Ku 蛋白修复断裂 DNA 的活性降低、DNA 结合活性降低; 氧化压力和酸性压力环境下, 耻垢分枝杆菌细胞内 Ku 蛋白数量降低, 乙酰化 Ku 蛋白数量变化不大。【结论】乙酰化修饰能够调节 Ku 蛋白的 DNA 结合活性, 从而调节非同源末端连接修复系统的活性; Ku 蛋白乙酰化程度升高是耻垢分枝杆菌对不良生长环境的反应。

关键词: 乙酰化, Ku, 非同源末端连接修复途径, 分枝杆菌

非同源末端连接修复途径(non-homologous end joining, NHEJ)是真核生物中维护基因组稳定性的重要机制, 少数原核生物特别是大多数的病原微生物中也有此系统, 与病原微生物在宿主中的生存以及耐药性相关。结核分枝杆菌是结核病的病原菌, 结核病是全球性传染病, 是单病引起死亡最多的病种, 也是艾滋病感染者的首要杀手(world health organization)。结核分枝杆菌的强致病性要求该菌的研究工作在生物安全等级高的实验室进行, 因此常规实验室常用其非致病性模式菌株——耻垢

分枝杆菌进行细菌的基本生理代谢研究。

结核分枝杆菌具有多种途径修复 DNA 双链断裂, 包括不依赖于 RecA 的单链退火途径, 依赖于 RecA 的同源重组和 NHEJ。不同生长时期不同修复途径占主导地位。Pitcher 研究表明 NHEJ 在耻垢分枝杆菌平台生长时期是主要的 DNA 双链断裂修复途径, 同源重组修复在对数生长期占主导地位^[1]。Ku 和 LigD 组成分枝杆菌最小 NHEJ 体系, 二者在酵母中共表达能够恢复 NHEJ 缺陷酵母细胞 50% 的 NHEJ 功能^[2], 在大肠杆菌中共表

基金项目: 佛山科学技术学院科研启动项目(Gg040916); 国家自然科学基金(XDA09030308)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-64888464; E-mail: blj@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-08-08; 修回日期: 2017-09-05; 网络出版日期: 2017-09-21

达能够使细菌胞内的线性质粒重新环化^[3]。Ku 以同源二聚体的形式结合双链 DNA 末端,特异性招募 LigD, LigD 的 POL 区域和 Ku 的 C 端介导两者的相互作用,随后 LigD 的核酸外切酶活性和连接酶活性完成断裂 DNA 的修复^[4]。

目前已经发现多种真核 NHEJ 翻译后修饰方式,包括磷酸化、泛素化和乙酰化^[5-7],以及调节真核 NHEJ 的多种机制^[8-9]。除了本研究小组前期发表的研究报告,尚未发现其他原核 NHEJ 翻译后修饰和调控机制。以 Ku 蛋白为诱饵蛋白进行垂钓,我们发现 Ku 蛋白和去乙酰化酶蛋白 Sir2 有相互作用,缺失 Sir2 降低耻垢分枝杆菌修复断裂 DNA 的效率^[10]。随后通过 Western blotting 和质谱分析,发现 Ku 蛋白有乙酰化修饰,发生在多个赖氨酸位点,其中第 29 位赖氨酸为重要的乙酰化位点^[11],但是乙酰化修饰对 Ku 蛋白活性的影响尚不清楚。本研究通过表达纯化具有乙酰化的 Ku 蛋白,结合定点突变和体外重组 NHEJ 系统,进一步分析乙酰化修饰给 Ku 蛋白带来的活性变化。

1 材料和方法

1.1 材料

耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* MC² 155 由本实验室保存,菌株培养使用添加 0.5%甘油和 0.05%吐温 80 的 LB 培养基,于 37 °C 培养。抗生素使用浓度为卡那霉素 30 µg/mL (购自 Amersco)、潮霉素 50 µg/mL (购自 Roche)。限制性核酸内切酶、DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶和 DNA marker 等购自 NEB 公司;DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。His 单克隆抗体和 TAP 抗体购自 Sigma 公司;乙酰化抗体购自 Cell Signaling 公司;HRP 标记的小鼠和兔抗

体购自 Promega;RpoA 多抗由本实验室制备和保存。杂交检测试剂盒和化学发光检测试剂盒购自 Thermo 公司。PCR 引物合成、5'-biotin-dsDNA 合成和 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。研究中使用的其他质粒和菌株见表 1。

1.2 蛋白的表达和纯化

表达质粒经测序验证序列正确后,电转化耻垢分枝杆菌,涂布抗性平板,37 °C 静置培养 3 d 长出单菌落。单菌落转接 5 mL 液体培养基,37 °C 200 r/min 培养 3 d。取 50 µL 菌液离心取沉淀,菌落 PCR 验证表达质粒的存在;1 mL 菌液离心取沉淀,加 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水煮 10 min,离心取上清通过 Western blotting 验证蛋白表达。经验证的耻垢分枝杆菌重组菌 37 °C、200 r/min 培养 1000 mL 菌液,5000×g 离心 10 min 收集菌体,50 mL 缓冲液(20 mmol/L Tris pH 8.0, NaCl 500 mmol/L, Triton X-100 0.1%,溶菌酶 1 mg/mL 和 5%甘油)重悬菌体,超声破碎菌体,12000×g 离心 30 min 去除细胞碎片。上清与 Ni-NTA 柱材料(购自 GE)孵育 30 min。依次用含有不同浓度咪唑的缓冲液(20 mmol/L Tris pH 8.0, NaCl 500 mmol/L 和 5%甘油)洗柱材料,最后用含 500 mmol/L 咪唑的缓冲液洗柱材料并收集洗脱液。不含咪唑的缓冲液透析洗脱液,5 kDa 浓缩管(购自 GE)收集和浓缩蛋白,分装成小份后-80 °C 保存蛋白。

1.3 NHEJ 体外活性测定

EcoR V 酶切 pET 质粒获得双链断裂 DNA 作为 DNA 底物。10 µL 反应体系中包含 MsLigD、Ku、50 µmol/L dNTPs, 1×T4 连接酶缓冲液(NEB)和 80 ng DNA 底物。混匀后,37 °C 孵育 1 h,加入 protease K 65 °C 反应 30 min 和 94 °C 反应 10 min。2 µL 反应体系转化 *E. coli* DH5α, 37 °C 过夜培养

表 1. 文中所用的菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Description	References/Sources
Strains		
Msm	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155. The most commonly used <i>M. smegmatis</i> strain; a high-frequency transformation mutant of the <i>M. smegmatis</i> strain ATCC 607	Our lab
ΔKu	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 derivate. The genomic Ku ORF was substituted by the hygromycin B resistance gene.	[10]
ΔSir2	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 derivate. A double unmarked (MSMEG_4620 and MSMEG_5175) mutant.	[11]
ΔLigD	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 derivate. The genomic LigD POL domain was substituted by the hygromycin B resistance gene.	[11]
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 Ku-TAP	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 derivate. TAP tag was inserted into the C terminal of genomic Ku gene.	[10]
<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 LigD-TAP	<i>M. smegmatis</i> MC ² 155 derivate. TAP tag was inserted into the C terminal of genomic LigD gene.	[10]
Plasmids		
pMV261	<i>Escherichia coli</i> -mycobacterial shuttle plasmid	Our lab
pMind	<i>E. coli</i> -mycobacterial shuttle plasmid	Our lab
pMind-MsKu	<i>M. smegmatis</i> Ku gene fused with 10*His tag was inserted into the pMind vector	This study
pMV261-MsKu	<i>M. smegmatis</i> Ku gene fused with 10*His tag was inserted into the pMV261 vector	[11]
pMV261-MtKu	<i>M. tuberculosis</i> Ku gene fused with 10*His tag was inserted into the pMV261 vector	This study
pMV261-MsKu 11-273	11-273 aa of <i>M. smegmatis</i> Ku fused with 10*His tag was inserted into the pMV261 vector	This study
pMV261-MsKu 11-273 K29R	K29R mutant of pMV261-MsKu 11-273	This study
pQE30-MsKu	<i>M. smegmatis</i> Ku gene was inserted into the pQE30 vector	[10]
pET28a-MsLigD	<i>M. smegmatis</i> LigD gene was inserted into the pET28a vector	[10]

后菌落计数。5 μL 反应体系作为模板，通用引物对 T7 terminator 和 T7 promoter、2×Taq mixture (购自 Genstar) 进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

1.4 Pull-down 检测 Ku-LigD 相互作用

收集平台期 *M. smegmatis* MC² 155 LigD-TAP 菌体，缓冲液(PBS, Triton X-100 0.1%，溶菌酶 1 mg/mL 和 5%甘油)重悬细胞，超声破碎菌体，12000×g 离心 30 min 去除细胞碎片。上清与 IgG 柱材料(购自碧云天)孵育 30 min，PBS 洗柱材料 3 次。柱材料分别与 MsKu 11-273 和其突变体蛋白

孵育 2 h，PBS 洗柱材料 3 次。SDS-PAGE 上样缓冲液重悬柱材料，沸水煮 5 min，分别用 His 和 TAP 抗体进行 Western blotting 分析。

1.5 EMSA 检测 Ku-DNA 相互作用

30 bp 5'-biotin-dsDNA、不同浓度 Ku 蛋白和其衍生蛋白与 T4 ligase 缓冲液混合，冰上孵育 15 min。6% PAGE 凝胶和 0.5×TBE 电泳缓冲液中分离 DNA，转移 DNA 至 Hybond-N⁺尼龙膜(购自 GE)，2×SSC 洗膜，紫外光照射尼龙膜 3 min，根据杂交检测试剂盒和化学发光检测试剂盒的说明书进行尼龙膜的封闭、孵育、洗膜和显影。

1.6 T4 Ligase 竞争法检测 Ku 与 DNA 末端的结合

参考 Weller 报道^[12], 具体步骤为 MsKu 11-273 和其 K29R 突变体蛋白分别与 80 ng DNA 底物和 1×T4 Ligase 缓冲液在冰上孵育 5 min; 加入 T4 Ligase (0.05 μL; NEB), 37 °C 孵育 1 h, 加入 protease K 65 °C 孵育 30 min, 94 °C 孵育 10 min; 2 μL 反应产物转化 *E. coli* DH5α, 1/10 细胞涂布 LB 平板, 37 °C 过夜培养后菌落计数。

1.7 不良环境对 Ku 乙酰化的影响

1.7.1 H₂O₂ 处理: 耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* MC² 155 Ku-TAP 培养至平台生长时期, 加入终浓度为 2 mmol/L H₂O₂, 继续培养并取样进行 Western blotting 分析。

1.7.2 酸处理: 耻垢分枝杆菌 *M. smegmatis* MC² 155 Ku-TAP 培养至平台生长时期, 加入 3 mol/L 醋酸钠 pH 5.2 (TaKaRa) 至终浓度为 10 mmol/L, 培养基 pH 从 7.0 降至 5.8 左右, 继续培养并取样进行 Western blotting 分析。

2 结果和分析

2.1 纯化 Ku 蛋白具有乙酰化修饰

耻垢分枝杆菌 Ku 蛋白(MsKu)由 328 个氨基酸组成, 结核分枝杆菌 Ku 蛋白(MtKu)由 273 个氨基酸组成, MsKu 的 11-273 位氨基酸与 MtKu 的 1-268 位氨基酸的序列相似性达到 79%。利用大肠杆菌表达体系过量表达和纯化 Ku 蛋白, 获得高纯度的 Ku 蛋白, Western blotting 分析乙酰化修饰, 结果呈阴性(结果未显示)。利用耻垢分枝杆菌表达体系获得的 Ku 蛋白, 具有乙酰化修饰(图 1)。截取 MsKu 保守区域 11-273 位氨基酸在耻垢分枝杆菌中进行表达和纯化, 获得的纯化蛋白具有乙酰化修饰。上述结果说明乙酰化修饰在耻垢分枝杆

菌和结核分枝杆菌 Ku 蛋白中保守, 并且仅分枝杆菌具有对应的乙酰化修饰酶类, 大肠杆菌不具备 Ku 蛋白乙酰化修饰需要的酶类。

2.2 Ku 蛋白过量表达影响细菌生长

分枝杆菌表达质粒 pMV261 利用 Hsp60 启动子组成型表达插入基因, 并且在 42 °C 热诱导条件下能够更高量地表达插入基因。比较重组菌 Msm/pMV261-MsKu、Msm/pMV261-MsKu 11-273 和对照菌 Msm/pMV261 在 37 °C 和 42 °C 的生长(图 2-A), 42 °C 培养的 LB 培养基上对照菌 Msm/pMV261 在培养第 3 天长出, Msm/pMV261-Ku 11-273 在

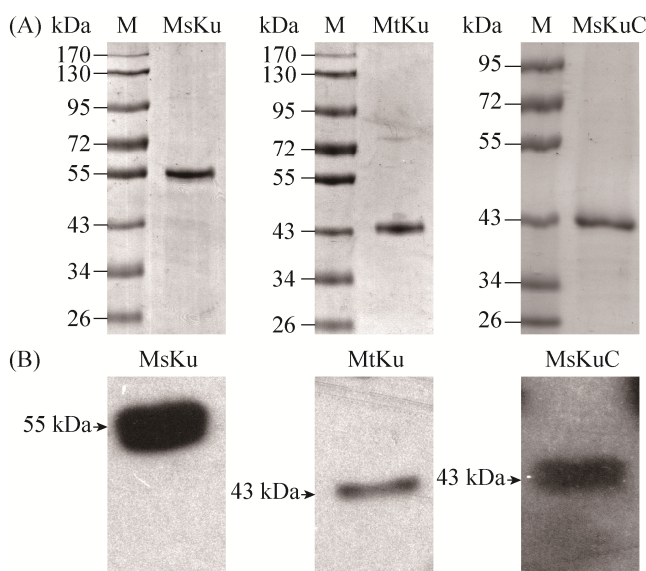


图 1. 纯化 Ku 蛋白的乙酰化

Figure 1. Acetylation of purified Ku proteins. A: C-terminal 10×His-tagged Ku proteins from cell lysates of the *M. smegmatis* recombinant strains were concentrated by Ni-agarose, purified and analysed by SDS-PAGE. MsKu, *M. smegmatis* Ku-10×His protein; MtKu, *M. tuberculosis* Ku-10×His protein; MsKuC, *M. smegmatis* Ku residues 11-273 fused with a 10×His tag. Positions and sizes (kDa) of marker proteins are shown on the left. B: Western blotting of purified proteins from *M. smegmatis* with an antibody specific to acetylated lysine.

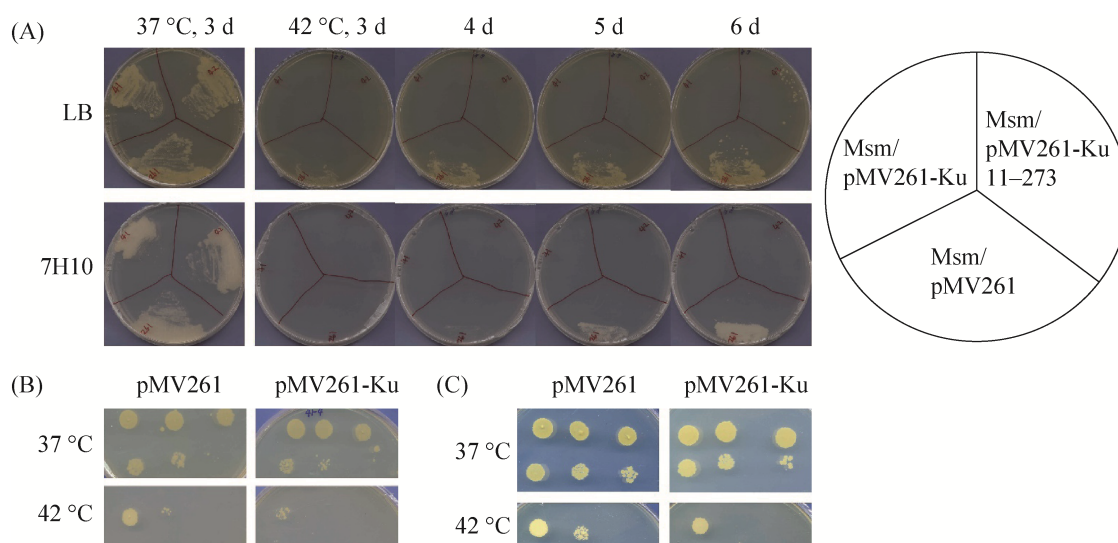


图 2. 野生菌中过量表达 MsKu 蛋白抑制细菌生长

Figure 2. Growth of MsKu over-expression *M. smegmatis* MC² 155 was restrained. Cells were streaked on LB or 7H10 (Difco) plates with kanamycin, and kept at 37 °C or 42 °C for 3–6 d (A), 5 µL Log (B) and Stationary (C) cells of *M. smegmatis* MC² 155/pMV261 and *M. smegmatis* MC² 155/pMV261-MsKu were diluted 10⁻¹–10⁻⁶ on 37 °C or 10⁰–10⁻² on 42 °C LB plates. Experiments were repeated three times and representative results are shown. Intact MsKu and its truncated mutant (11–273 aa) were expressed in *M. smegmatis* MC² 155 using the pMV261 plasmid.

培养的第 6 天长出, Msm/pMV261-Ku 在培养的 6 d 内一直未长出; 42 °C 培养的 7H10 培养基上对照菌在培养第 4 天长出, Msm/pMV261-Ku 11-273 和 Msm/pMV261-Ku 一直未长出。42 °C 时对照菌 Msm/pMV261 在 LB 培养基上比在 7H10 培养基上生长速度快, 说明 LB 培养基更有利于耻垢分枝杆菌的生长, 因此 42 °C 培养 6 d 时 Msm/pMV261-Ku 11-273 在 LB 培养基上形成菌落而 7H10 培养基上无菌落的原因是生长速度的差异。将 Msm/pMV261-Ku 和 Msm/pMV261 培养菌液进行系列稀释后分别滴在 LB 培养基上, 分析 Msm/pMV261-Ku 在 42 °C 培养条件时是否完全不生长。结果如图 2-B 和 2-C, 42 °C 培养时仅未经稀释的 Msm/pMV261-Ku 培养菌液能够长出菌落, 比 Msm/pMV261 的菌落数低 10 倍, 说明 42 °C 培养时 Msm/pMV261-Ku 生长受到了抑制作用而非杀菌作用。

Ku 和 LigD 组成了分枝杆菌的最小非同源末端连接体系, Ku 蛋白识别并结合断裂 DNA, 随后招募 LigD 对 DNA 末端进行酶切和连接反应, 目前尚未发现细菌 Ku 蛋白具有其他生理活性。为了探讨上述 MsKu 过量表达抑制细菌生长的表型是否与 NHEJ 活性相关, 在 LigD 功能丧失的缺陷菌中观察 MsKu 过表达菌的生长表型。分枝杆菌 pMind 表达质粒能在诱导剂四环素的作用下表达插入基因, 并且插入基因的表达量与诱导剂的使用浓度成正相关。如图 3 所示, 对照菌 ΔLigD/pMind 在四环素浓度为 0、20、200 ng/mL 的生长差异不大, 而 ΔLigD/pMind-MsKu 的生长随四环素浓度增加而菌落数减少, 说明 Ku 过量表达抑制细菌生长的表型与 NHEJ 活性不相关。大肠杆菌基因组中无 NHEJ 基因, 不具有 NHEJ 体系。在大肠杆菌中过量表达 Ku 蛋白, 菌株 BL21/pQE30-MsKu 培养菌液系列稀释后滴加在含有诱导剂 IPTG 的

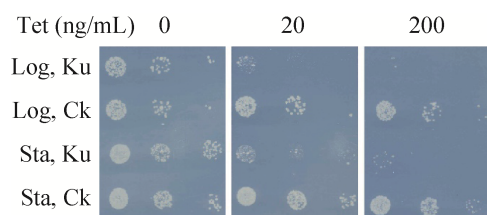


图 3. LigD 缺陷菌中过量表达 MsKu 蛋白抑制细菌生长
Figure 3. Growth of MsKu over-expression LigD deficient strain was restrained. Log and Stationary phase cells of Δ LigD/pMind-MsKu were diluted 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , and then 5 μ L cell samples were cultured on hygromycin plates with different inducer (tetracycline) concentrations (0 ng/mL, 20 ng/mL and 200 ng/mL). Δ LigD/pMind was used as the control. This experiment was repeated three times and representative results are shown.

培养基上, 37 °C 或者 30 °C 诱导过夜后, 也表现为在含有 IPTG 的培养基上仅培养菌液的原液能生长, 其他稀释浓度不能生长, 而不含有 IPTG 的培养基上培养菌液和稀释菌液均能生长(数据未显示), 该结果也支持 Ku 过量表达抑制细菌生长与 NHEJ 活性不相关。

为了分析第 29 位赖氨酸发生乙酰化修饰对 MsKu 活性的影响, 拟从耻垢分枝杆菌中表达和纯化 MsKu 蛋白和其 K29R 突变体蛋白。将氨基酸 K 替换成 R 通常在蛋白质乙酰化修饰研究中用来模拟非乙酰化修饰时的蛋白^[13]。尝试在耻垢分枝杆菌的野生型菌株、Ku 缺陷菌和去乙酰化酶 Sir2 缺陷菌中表达蛋白, MsKu 表达质粒在 Ku 缺陷菌和 Sir2 缺陷菌中无法表达 MsKu 蛋白, MsKu K29R 表达质粒在野生型菌株中无法表达 MsKu K29R 蛋白。这些重组菌无法表达相应蛋白, 可能与前述现象原因一致, 都是由于 Ku 过量表达引起了细菌生长受阻。MsKu 截短体蛋白 Ku 11-273 和其 K29R 突变体表达质粒能够在野生型菌株和 Ku 缺陷菌中表达对应蛋白, 将用来分析第 29 位氨基酸发生乙酰化修饰对 Ku 活性的影响。

2.3 MsKu 11-273 和其突变体的 NHEJ 活性有差异

从耻垢分枝杆菌中纯化截短体蛋白 MsKu 11-273 和其 R29 突变体(图 4-A), Western blotting 分析两者的乙酰化差异, 如图 4-B 所示 MsKu 11-273 K29R 的乙酰化抗体杂交条带很弱, 曝光时间长达 60 s 时才出现微弱的杂交条带, 而相应曝光时间下 MsKu 11-273 出现很强的乙酰化抗体杂交条带, 说明第 29 位氨基酸由 K 突变为 R 后 MsKu 11-273 的乙酰化修饰基本消除。

经典 NHEJ 体外活性测定是利用 Ku 和 LigD 在合适的反应条件下将 2 个断裂 DNA 重新连接, 连接产物既可以用 PCR 方法检测断裂 DNA 是否修补达到设计长度, 也可以检测修复断裂质粒形成抗性菌落, 或者利用电泳检测同位素标记的 DNA 底物。本研究采用前两种检测方法分析 NHEJ 修复产物。如图 4-C 所示, 含有 200 ng MsKu 11-273 的体外 NHEJ 体系修复 DNA 为模板进行 PCR 反应, 产生明显的 PCR 扩增产物, 10 ng MsKu 11-273 K29R 突变体产生相似的 PCR 扩增条带。随着 MsKu 11-273 K29R 增加到 40 ng, PCR 产物亮度略有增加, 但是 MsKu 11-273 K29R 增加到 200 ng 时, PCR 产物的亮度与 40 ng MsKu 11-273 K29R 样品相似, 比阳性对照 T4 Ligase 的 PCR 产物亮度低, 说明 200 ng MsKu 11-273 K29R 未完成所有 DNA 底物的修复, 修复 DNA 底物数量用 PCR 产物亮度只能定性而不能定量比较。断裂的质粒 DNA 经 NHEJ 修复后, 转化大肠杆菌, 1 个修复产物理论上产生 1 个菌落, 比较各反应产生的菌落数(图 4-D), MsKu 11-273 K29R 在 10、40、200 ng 3 个浓度梯度产生的菌落数逐渐升高, 其中 40 ng MsKu 11-273 K29R 产生的菌落数与 200 ng MsKu 11-273 产生的菌落数相似。以上结果表明 MsKu 11-273 K29R 的 NHEJ 活性比 MsKu 11-273 高。

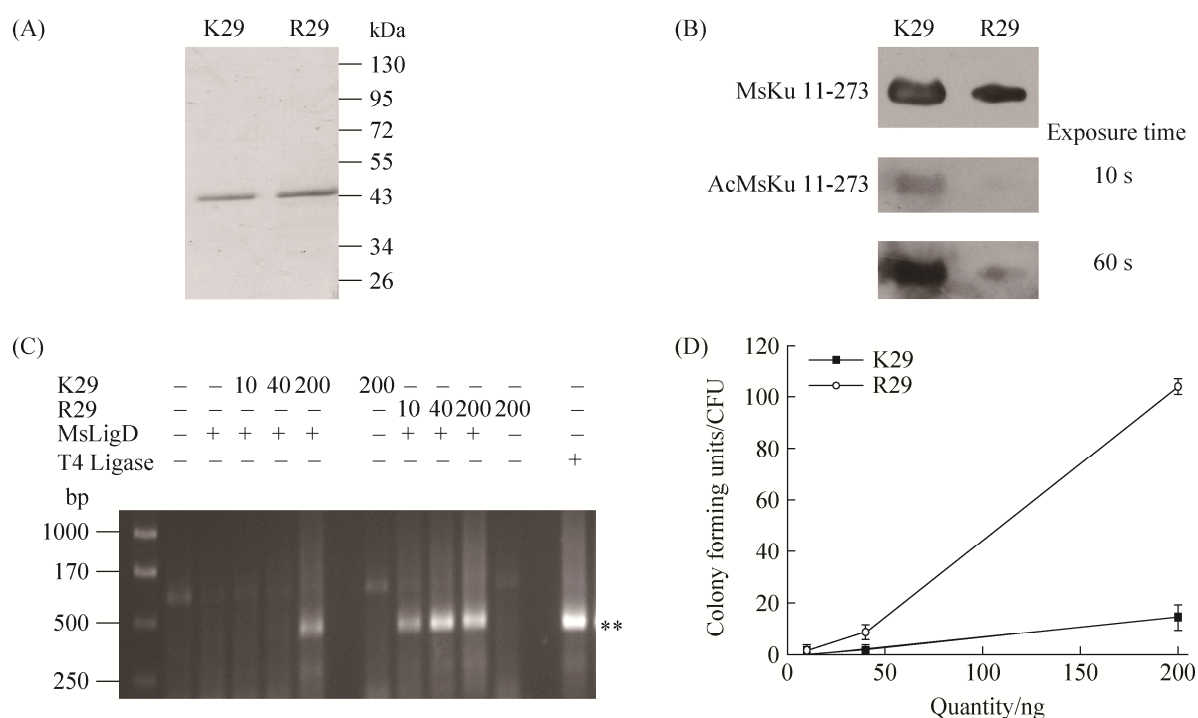


图 4. MsKu 11-273 和 MsLigD 修复双链断裂 DNA

Figure 4. Joining of blunt-ended DSBs by MsKu 11-273 and MsLigD. A: MsKu 11-273 (K29) and its R29 mutant (Lys-29 substituted with Arg) were purified from *M. smegmatis* using a Ni-NTA system. Purified proteins were analysed by SDS-PAGE (kDa). B: Western blotting of MsKu 11-273 (K29) and its R29 mutant purified from *M. smegmatis* with His-Ab and AcLys-Ab. C: Plasmid DNA cut by EcoR V was incubated with increasing amounts (10 ng, 40 ng and 200 ng) of MsKu 11-273 (K29) or its mutant (R29). NHEJ in these reactions was assessed by PCR (C) or by counting *E. coli* transformant colonies (D). The positions and sizes (bp) of marker DNA are shown on the left. Error bars represent the standard deviation based on triplicate experiments. ** 400 bp PCR fragment generated by NHEJ.

2.4 MsKu 11-273 和其突变体的稳定性以及与 LigD 互作无显著差异

MsKu 11-273 K29R 的 NHEJ 活性比 MsKu 11-273 高, 其原因是什么? 尝试从蛋白的稳定性和 NHEJ 组成蛋白质之间的相互作用两个方面比较 MsKu 11-273 K29R 和 MsKu 11-273 蛋白的生化活性。如图 5-A 所示, 体外重组 NHEJ 反应体系中 MsKu 11-273 K29R、MsKu 11-273、MsKu 三种蛋白的稳定性相似, 均为 37 °C 孵育 60 min 和 30 min 两个时间点的蛋白量相似, 比 0 min 时间点的蛋白量略低。

耻垢分枝杆菌基因组的 LigD 基因 C 端融合表

达 TAP 标签, 利用 TAP 标签与 Ig G 柱材料的亲和性固定 LigD, pull down 其互作蛋白。如图 5-B 所示 LigD pull down 结果, 前 3 个泳道作为阴性对照排除了 IgG beads 非特异吸附 Ku 蛋白的可能性, 保证后续检测的蛋白质之间的相互作用是特异性的; 随后的两个泳道作为阳性对照, 验证体系中 MsKu 11-273 K29R 和 MsKu 11-273 蛋白稳定存在; 以 LigD 为诱饵, 垂钓的 MsKu 11-273 K29R 和 MsKu 11-273 蛋白的杂交条带仅有微弱差异, 说明 MsKu 11-273 K29R 和 MsKu 11-273 蛋白分别与 LigD 的相互作用无显著差异。

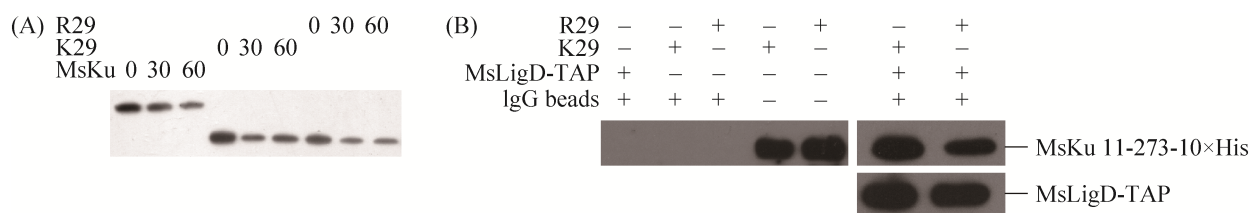


图 5. MsKu 突变体的稳定性和招募 LigD

Figure 5. Protein stability and LigD interaction of MsKu derivatives. A: Protein stability of MsKu 11-273 (K29) and its K29R mutant (R29) in T4 ligase buffer. 1 μ g 10 \times His-tagged proteins were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 0 min, 30 min or 60 min in 1 \times T4 ligase buffer (NEB), and then electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and Western blotting with His-Ab. B: LigD interaction activity of MsKu 11-273. MsKu 11-273 (K29) and its K29R mutant (R29) (20 μ g) were incubated separately with MsLigD-TAP-bound beads for 2 h. After equilibrating with the wash buffer, all proteins bound to the beads were analyzed by immunoblotting with antibodies specific to the His tag or TAP tag.

2.5 MsKu 11-273 和其突变体蛋白的 DNA 结合活性有差异

Ku 蛋白在 NHEJ 体系中最重要的是识别并结合到断裂 DNA 末端,从而开启 NHEJ 修复途径。利用 EMSA 方法可比较 MsKu 蛋白和其突变体蛋白的 DNA 结合活性。目前对于原核 Ku 蛋白结合 DNA 需要的最小 DNA 长度未知, MtKu 与 33 bp dsDNA 形成一条迁移带^[14], 因此设计将 30 bp 5'-biotin-dsDNA 与 50 pmol 或 100 pmol MsKu11-273 和其突变体蛋白孵育。如图 6-A 所示, 50 pmol 和 100 pmol MsKu 11-273 K29R 突变体与 30 bp DNA 底物形成迁移条带, 无 biotin 标记的 DNA 底物作为竞争物加入孵育体系能使迁移条带消失, 说明该迁移带为 MsKu 11-273 K29R 结合 DNA 底物形成的复合物。相同条件下, 50 pmol 和 100 pmol MsKu 11-273 与 30 bp DNA 底物均无迁移带产生。未加蛋白的对照孔有相同量的 5'-biotin-dsDNA (3 fmol), 但无显影条带, 猜测游离 DNA 在电泳过程中发生扩散, 使得胶上局部 DNA 浓度过低而超出检测阈值。增加 DNA 用量至 6 fmol (图 6-B), 未加蛋白的对照孔出现显影条带, 说明提高 DNA 浓度能够使胶上游离 DNA 被检测。100 pmol MsKu

11-273 K29R 与 3 fmol DNA 底物形成单一的迁移条带, 与 6 fmol DNA 底物形成的迁移条带呈弥散性拖尾, 说明提高反应体系中 DNA 浓度会引起蛋白-DNA 复合物的稳定性降低而在胶上呈现出非单一的迁移条带。与 6 fmol DNA 底物对照孔相比, 100 pmol MsKu 11-273 样品中的 DNA 底物有少量弥散性拖尾, 而 DNA 竞争物能够消除这种拖尾, 说明该弥散性拖尾为 MsKu 11-273 与 DNA 底物结合而使 DNA 发生迁移, 但是形成的蛋白-DNA 复合物的数量和稳定性都很低, 仅能使 DNA 发生少量拖尾。MsKu 与 MsKu 11-273 K29R 形成相似的迁移条带。以上结果都说明 MsKu 11-273 比 MsKu 11-273 K29R 的 DNA 结合活性低, MsKu 11-273 截短体是全长 MsKu 的 DNA 结合力降低的突变体。

Ku 蛋白结合 DNA 底物后, 能够在 DNA 链上滑动, 最终发挥 NHEJ 作用的位点是位于断裂 DNA 的末端, 而 EMSA 不能分辨蛋白结合 DNA 位点是位于 DNA 中间或者末端。T4 Ligase 直接连接 2 个 DNA 末端 3'-hydroxyl 和 5'-phosphoryl, 如果 DNA 末端被其他蛋白占据, 需要 T4 Ligase 竞争 DNA 末端才能进行连接反应, T4 Ligase 的连接酶活性将降低, 因此 T4 Ligase 竞争法能够分析

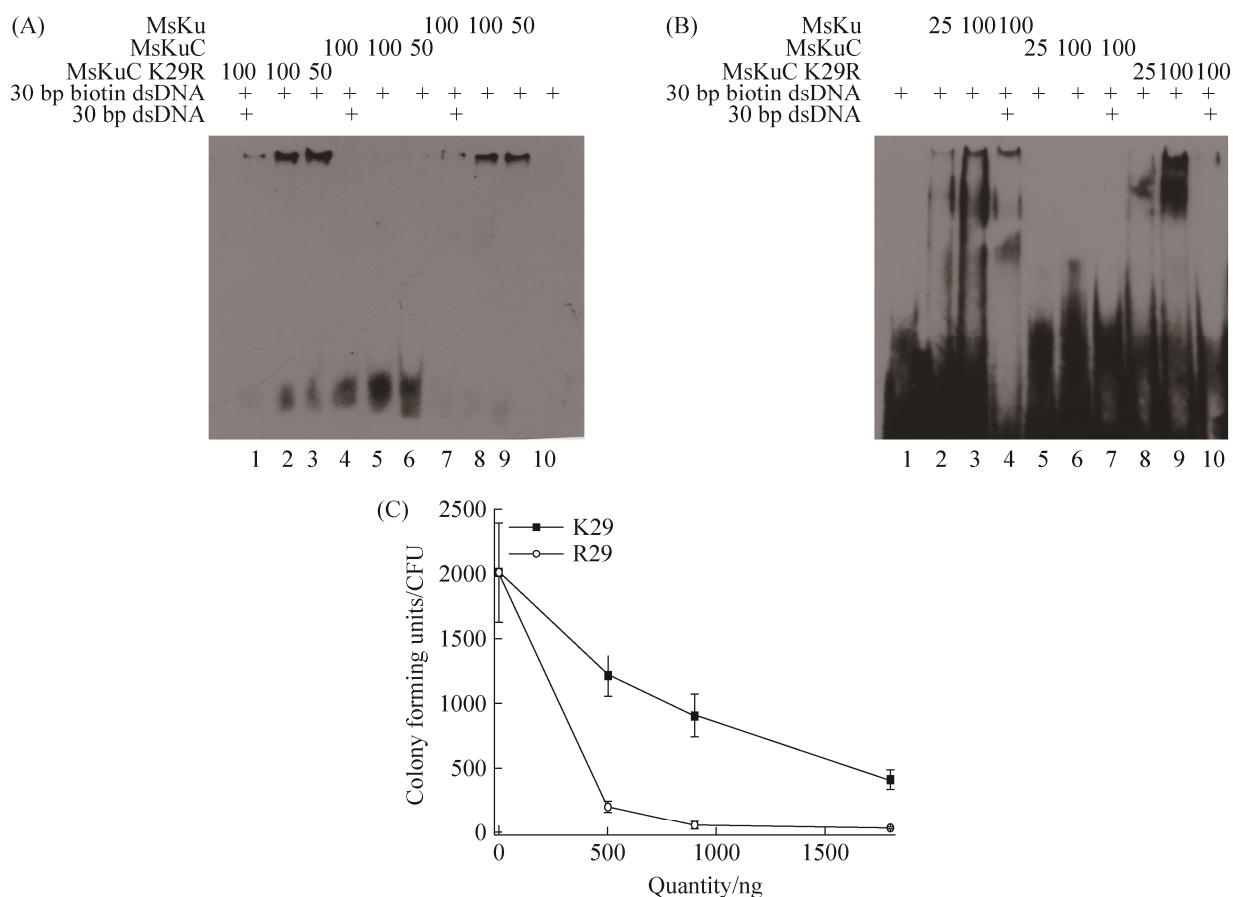


图 6. EMSA 分析 MsKu 突变体蛋白的 DNA 结合活性

Figure 6. DNA binding activity of MsKu derivatives. Reaction mixtures contained T4 Ligase buffer, 3 fmol (A) and 6 fmol (B) 30 bp 5'-biotin-dsDNA and increasing quantity (pmol) of MsKu derivatives. C: T4 Ligase was incubated with increasing amounts (500, 900 and 1800 ng) of MsKu 11-273 (MsKuC) or its mutant (K29R). The ligation product was transformed into *E. coli*, and colonies were counted after overnight culture. Error bars represent the standard deviation based on triplicate experiments. MsKu 11-273, MsKuC and K29. MsKu 11-273 K29R, MsKuC K29R and R29.

位于 DNA 末端的蛋白结合^[14]。如图 6-C 所示,随着体系中 MsKu 11-273 浓度的增加,T4 Ligase 连接断裂质粒 DNA 而产生的抗性菌落数量降低,含有 MsKu 11-273 K29R 反应体系比含有 MsKu 11-273 反应体系产生的菌落数更少,说明 MsKu 11-273 K29R 结合 DNA 末端的活性比 MsKu 11-273 高。

2.6 Ku 蛋白乙酰化修饰是分枝杆菌对不良环境的反应

前面研究发现耻垢分枝杆菌 Ku 蛋白乙酰化

修饰水平在对数期比平台生长期低^[11]。与对数期细菌相比,平台期细菌的生存环境更差,猜测 Ku 蛋白的乙酰化修饰水平可能与生存环境相关。分析耻垢分枝杆菌在氧化压力和酸性培养条件时,Ku 蛋白的乙酰化修饰水平变化,结果如图 7 所示,在双氧水产生的氧化压力培养条件下,Ku 蛋白在耻垢分枝杆菌细胞内的数量随时间逐渐降低,4 h 时 Ku 蛋白杂交条带的强度比 2 h 的杂交条带强度明显降低,而 4 h 时乙酰化 Ku 蛋白与 2 h

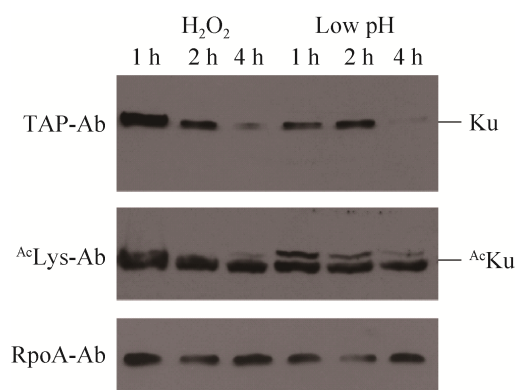


图 7. 氧化压力和酸性培养条件时 Ku 蛋白的乙酰化
Figure 7. Acetylation of Ku in *M. smegmatis* under environment stress. *M. smegmatis* MC² 155 Ku-TAP was treated with H₂O₂ (2 mmol/L) and NaAc pH 5.2 (10 mmol/L), and bacterial cells were collected at 1 h, 2 h and 4 h. Total cell lysates were Western blotted with TAP-tag antibody and acetylated lysine antibody. RpoA was set as loading control.

时乙酰化 Ku 蛋白的杂交条带强度相似,说明 4 h 时 Ku 蛋白的乙酰化程度更高。酸性培养条件下,4 h 时 Ku 蛋白杂交条带很弱,2 h 和 1 h 时 Ku 蛋白杂交条带强度相似,而 3 个取样时间点时乙酰化 Ku 蛋白的杂交条带强度相似,说明 4 h 时 Ku 蛋白的乙酰化程度更高。

3 讨论

早期研究发现耻垢分枝杆菌随生长时间提高自身 Ku 蛋白的乙酰化水平,同时耻垢分枝杆菌 NHEJ 活性逐渐降低^[10],推测 Ku 乙酰化修饰可能与细菌 NHEJ 活性相关。本研究通过表达纯化不同乙酰化状态的 Ku 蛋白,体外重组 NHEJ 体系,比较了不同乙酰化状态 Ku 蛋白的 NHEJ 活性差异,蛋白-蛋白互作和蛋白-DNA 互作分析比较了不同乙酰化状态 Ku 蛋白与大分子相互作用的差异,发现乙酰化水平较高的 Ku 蛋白具有较低的 NHEJ 活性以及较低的 DNA 结合活性,表明 Ku

蛋白通过乙酰化修饰降低其 DNA 结合活性,从而降低 NHEJ 体系的活性,首次证明了原核生物 Ku 蛋白的活性调控机制。

蛋白质的赖氨酸乙酰化修饰是一种可逆的翻译后修饰,在真核生物和原核生物中发挥着重要的调控作用,越来越多的证据表明赖氨酸乙酰化修饰可能在结核分枝杆菌引起结核病中起重要作用。例如 Liu 等^[15]发现临床结核病人 T 淋巴细胞对结核分枝杆菌免疫原蛋白 HspX 的 62–91 位氨基酸组成的肽段有免疫反应,而对乙酰化的该肽段的免疫反应非常微弱。Lange 等^[16]发现乙酰化干扰结核菌毒力相关复合物 ESAT-6/CFP-10 的形成。前期我们测定耻垢分枝杆菌在生长周期的不同时间点的 NHEJ 活性,首次发现平台期细菌比对数期细菌的 NHEJ 活性低,这种变化的调控机制尚不清楚,此外我们还检测到平台期细菌的 Ku 蛋白乙酰化水平比对数期高^[11]。本研究发现乙酰化修饰调节 Ku 蛋白与 DNA 的结合力,能够解释上述 NHEJ 活性变化的现象,即对数期细菌的 Ku 蛋白乙酰化水平低、DNA 结合力较高、NHEJ 活性较高,进入平台期 Ku 蛋白乙酰化程度逐渐升高、DNA 结合力降低,从而降低 NHEJ 活性。

乙酰化修饰是如何调节 Ku 蛋白与 DNA 的相互作用呢?我们试图从乙酰化修饰重要位点的空间位置切入。尽管目前尚无原核生物 Ku 蛋白的晶体结构,其真核同源蛋白的结构已经获得解析。原核生物 Ku 蛋白与真核生物 Ku 蛋白的 β 桶结构域和螺旋臂结构域相似,两者的主要差别是真核生物 Ku 蛋白 N 端多了 α/β 结构域^[14,17]。 β 桶结构域是 DNA 结合域,由 7 个反向平行 β 片层组成,桶中部的两个 β 片层之间插入一段 70 个氨基酸序列形成桥梁状结构(β -bridge),DNA 从 β -bridge 穿过。 β -bridge 含有带正电荷的氨基酸,与 DNA 负电荷

互补,形成稳定的 DNA-蛋白相互作用。螺旋臂结构域是二聚化区域,原核生物 Ku 蛋白是由 2 个 Ku 蛋白组成的同源二聚体,真核生物 Ku 蛋白是由结构相似的 2 个亚基组成的异源二聚体。第 29 位赖氨酸是重要的乙酰化位点,该位点突变引起分枝杆菌细胞内 Ku 蛋白表达量和乙酰化水平的变化^[11]以及 Ku 蛋白 DNA 结合力的变化(图 6),该位点对应于真核生物 Ku 蛋白的第 279 位赖氨酸,位于真核生物 Ku 蛋白 DNA 结合域的 β -bridge 区域^[18]。因此 MsKu 11-273 的第 29 位为赖氨酸时比为精氨酸时 DNA 结合活性低,可能是赖氨酸或者精氨酸携带的正电荷能够稳定蛋白与带负电荷 DNA 的相互作用,赖氨酸发生乙酰化修饰中和了正电荷,精氨酸不能发生乙酰化修饰,造成 MsKu 11-273 蛋白比其 K29R 突变体的 DNA 结合力低。

结合本研究(图 7)和早期研究^[11]的实验数据,我们发现耻垢分枝杆菌在三种生理条件下提高自身 Ku 蛋白乙酰化水平,即进入平台生长时期,面对氧化压力和酸性培养条件,三种生理条件的共性是均不利于细菌生长。我们也发现 Ku 蛋白的过量表达会造成细菌生长被抑制(图 2),该表型与 NHEJ 活性无关(图 3),与 Ku 蛋白自身乙酰化水平的低(对数生长期)或者高(平台生长期)无关,降低 Ku 蛋白的 DNA 结合力(突变体 MsKu 11-273)能够消除这种抑制表型。因此猜测 Ku 蛋白影响细菌生长的工作模型可能是 Ku 蛋白的 DNA 结合活性与细菌生长相关,过量的 Ku-DNA 互作不利于细菌生长,细菌生长被抑制负反馈 Ku-DNA 互作, Ku-DNA 互作的调节机制之一是 Ku 蛋白的乙酰化修饰,另外一种调节机制是降低 Ku 蛋白的数量。综上所述,本研究证明 Ku 蛋白乙酰化修饰的生理功能是调节 Ku-DNA 相互作用,此外本研究提出了 Ku-DNA 互作调节细菌生长的工作模型,为深

入研究 Ku 蛋白功能提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Pitcher RS, Green AJ, Brzostek A, Korycka-Machala M, Dziadek J, Doherty AJ. NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation. *DNA Repair*, 2007, 6(9): 1271–1276.
- [2] Della M, Palmbos PL, Tseng H-M, Tonkin LM, Daley JM, Topper LM, Pitcher RS, Tomkinson AE, Wilson TE, Doherty AJ. Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, 2004, 306(5696): 683–685.
- [3] Malyarchuk S, Wright D, Castore R, Klepper E, Weiss B, Doherty AJ, Harrison L. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* Ku and ligase D in *Escherichia coli* results in RecA and RecB-independent DNA end-joining at regions of microhomology. *DNA Repair*, 2007, 6(10): 1413–1424.
- [4] Gong CL, Bongiorno P, Martins A, Stephanou NC, Zhu H, Shuman S, Glickman MS. Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(4): 304–312.
- [5] Postow L, Ghenoïu C, Woo EM, Krutchinsky AN, Chait BT, Funabiki H. Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 182(3): 467–479.
- [6] Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyeroba TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, 2004, 13(5): 627–638.
- [7] Feng L, Chen JJ. The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2012, 19(2): 201–206.
- [8] Lees-Miller SP, Beattie TL, Tainer JA. Noncoding RNA joins Ku and DNA-PKcs for DNA-break resistance in breast cancer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(6): 509–510.
- [9] Iwasaki D, Hayashihara K, Shima H, Higashide M, Terasawa M, Gasser SM, Shinohara M. The MRX complex ensures NHEJ fidelity through multiple pathways including Xrs2-FHA-dependent Tel1 activation. *PLoS Genetics*, 2016, 12(3): e1005942.
- [10] Li ZD, Wen JK, Lin YN, Wang SH, Xue P, Zhang ZP, Zhou Y, Wang X, Sui L, Bi LJ, Zhang XE. A Sir2-like protein participates in mycobacterial NHEJ. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e20045.
- [11] Zhou Y, Chen T, Zhou L, Fleming J, Deng JY, Wang XE,

- Wang LW, Wang YY, Zhang XL, Wei WJ, Bi LJ. Discovery and characterization of Ku acetylation in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(6), doi: 10.1093/femsle/fnu051.
- [12] Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, Della M, Devine SK, Day JP, Wilkinson A, d'Adda di Fagagna F, Devine KM, Bowater RP, Jeggo PA, Jackson SP, Doherty AJ. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, 2002, 297(5587): 1686–1689.
- [13] Li MY, Luo JY, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(52): 50607–50611.
- [14] 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): 607–614.
- [15] Liu FY, Yang MK, Wang XD, Yang SS, Gu J, Zhou J, Zhang XE, Deng JY, Ge F. Acetylome analysis reveals diverse functions of lysine acetylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(12): 3352–3366.
- [16] Lange S, Rosenkrands I, Stein R, Andersen P, Kaufmann SH, Jungblut PR. Analysis of protein species differentiation among mycobacterial low-Mr-secreted proteins by narrow pH range Immobilized gel 2-DE-MALDI-MS. *Journal of Proteomics*, 2014, 97: 235–244.
- [17] Doherty AJ, Jackson SP, Weller GR. Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Letters*, 2001, 500(3): 186–188.
- [18] 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 Research*, 2001, 11(8): 1365–1374.

Acetylation reduced the DNA binding activity of Ku protein

Ying Zhou^{1,2}, Lijun Bi^{2*}

¹Foshan University, Foshan 528000, Guangdong Province, China

²Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To understand the role of acetylation modification on the activity of Ku protein. **[Methods]** Acetylated Ku protein and its non-acetylated mutant were expressed and purified using *M. smegmatis* expression system, and then their biochemical activities were compared. The effect of oxidative stress and acidic environment on Ku protein acetylation level were analyzed in *M. smegmatis*. **[Results]** Ku protein over-expression *M. smegmatis* strain grew slower than the control strain transformed with the empty plasmid. Acetylated Ku protein had lower DNA repair activity and DNA binding activity than the non-acetylated Ku. Quantity of Ku protein in *M. smegmatis* cells under oxidative and acidic stress decreased, whereas there was subtle change of acetylated Ku protein. **[Conclusion]** Acetylation modification can regulate the DNA binding activity of Ku protein, thus regulate the activity of Non-homologous end joining system. The increase of acetylation level of Ku protein is the response of mycobacteria against the adverse growth environment.

Keywords: acetylation, Ku, NHEJ, mycobacteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Start-Up Research Project of Foshan University (Gg040916) and by the National Natural Science Foundation of China (XDA09030308)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64888464; E-mail: blj@sun5.ibp.ac.cn

Received: 8 August 2017; Revised: 5 September 2017; Published online: 21 September 2017