

·放射生物学·

转录反式激活因子对 DNA-PKcs 启动子的调控作用

杨天一 张士猛 秦夏 李兵 刘晓丹 周平坤

【摘要】目的 检测人类免疫缺陷病毒转录反式激活因子(TAT)对 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位(DNA-PKcs)基因启动子活性的影响。**方法** 用 PCR 方法克隆 DNA-PKcs 基因启动子的系列截短体,通过 DNA 重组构建 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子报告质粒载体,通过双荧光素酶报告基因检测 DNA-PKcs 基因的启动子活性,采用基于乳糖抑制子和乳糖操纵子并结合绿色荧光蛋白分子荧光的大规模染色质松弛报告系统观察染色质的重构活性,并研究了电离辐射对 TAT 参与染色体重构的影响。**结果** 构建了 DNA-PKcs 启动子(全长区域为 -939 bp~-1 bp)的系列截短体的报告质粒载体,鉴定出其核心区域为 -64 bp~-1 bp。TAT 能够抑制 DNA-PKcs 基因启动子的转录活性。TAT 具有大规模的染色质松弛活性,电离辐射能抑制 TAT 参与染色体重构的作用。**结论** TAT 能抑制 DNA 修复基因 DNA-PKcs 的启动子活性,电离辐射能抑制 TAT 参与染色体重构的作用。

【关键词】 反式激活;辐射效应;DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位基因启动子;染色体重构

The regulation of transactivator of transcription on the activity of DNA-PKcs promoter YANG Tian-yi, ZHANG Shi-meng, QIN Xia, LI Bing, LIU Xiao-dan, ZHOU Ping-kun. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China

Corresponding author: ZHOU Ping-kun, Email: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To explore the influence of human immunodeficiency virus transactivator of transcription(TAT) on the promoter activity of DNA dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). **Methods** The truncated promoters of DNA-PKcs were cloned by PCR from the template DNA from HeLa genomic DNA, and the pGL3-basic-DNA-PKcs promoter reporter plasmids were constructed. The activity of DNA-PKcs promoters was detected by dual-luciferase reporter assay system. A Lac-repressor and Lac-operator based green fluorescent protein imaging system was used to assay the chromatin remodeling activity. **Results** A series of reporter plasmids harboring the truncated promoters of DNA-PKcs from -939 bp to -1 bp were constructed. The sequence of -64 bp to -1 bp was identified as a critical element for the activity of DNA-PKcs promoter. TAT can suppress the activity of DNA-PKcs promoter. TAT participates in the regulation of the large scale chromatin relaxation. Ionizing radiation attenuates the activity of TAT played in the chromatin remodeling. **Conclusion** TAT represses the promoter activity of DNA repair protein DNA-PKcs, and also play a role of large scale chromatin remodeling which can be attenuated by ionizing radiation.

【Key words】 Trans-activation; Radiation effects; DNA dependent protein kinase catalytic subunit promoter; Chromatin remodeling

转录反式激活因子(transactivator of transcription, TAT)是人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的非结构蛋白,其作为早期的调节因子,在 HIV-1 的病毒复制中发挥了重要的作用。

感染 HIV-1 的细胞将 TAT 释放到细胞外,被释放出来的 TAT 通过其转导域能够自由地穿梭于非感染的细胞^[1]。越来越多的研究显示, TAT 在诱发获得性免疫缺陷综合征相关的肿瘤中发挥了重要的作用^[2]。体内外的实验提示, TAT 本身与肿瘤细胞的增殖有密切的联系^[3]。TAT 与宿主细胞的相互作用方式和机理受到关注。

DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位(DNA dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs)属于磷脂

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.01.008

基金项目: 国家自然科学基金(30970677, 81071361)

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研

究所

通信作者: 周平坤(E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn)

酰肌醇 3-激酶相关激酶超家族^[4]。DNA-PKcs 与其他两个亚单位 Ku70 和 Ku80 共同构成 DNA-PKcs 复合物,参与 DNA 双链断裂的非同源末端连接修复过程^[5]。DNA-PKcs 的活性是决定机体放射敏感性的重要因素之一。低表达 DNA-PKcs 的肿瘤对放疗反应敏感。对辐射高度敏感的神经胶质瘤细胞 M059J,其 DNA-PKcs 基因的第 32 号外显子丢失了一个碱基,由此造成的移码突变使得 DNA-PKcs 基因的翻译提前终止。DNA-PKcs 在细胞 DNA 的损伤修复以及维持基因组稳定性方面发挥了重要的作用^[6]。

本实验室的前期工作显示,转染 TAT 基因的细胞中,DNA-PKcs 的 mRNA 和蛋白水平都有明显降低^[7]。本研究在此基础上进一步从人的基因组 DNA 中克隆出 DNA-PKcs 的启动子,构建成报告基因表达载体,通过双荧光素酶报告基因系统检测 TAT 对 DNA-PKcs 启动子活性的影响,探讨 TAT 如何在转录水平上调控 DNA-PKcs 的转录,并观察电离辐射对 TAT 蛋白染色体重构功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人胚胎肾 293T 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞由本室保存;二氢叶酸还原酶基因敲除的中国仓鼠卵巢 AO3_1 细胞由 Andrew S. Belmont 博士(美国伊利诺伊大学)赠送,军事医学科学院生物工程研究所叶棋浓教授实验室长期保存;真核表达 TAT 蛋白的质粒 pcDNA3.1-Flag-TAT、用于染色质重构分析的质粒 pEGFP-Lac-TAT 及对照质粒 pEGFP-Lac 由本室构建和保存;TAT 蛋白由本室表达、纯化并保存。细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000 为美国 Invitrogen 公司产品;pGL3-basic 载体(一种荧光素酶报告基因载体)及双荧光素酶报告基因检测试剂盒为美国 Promega 公司产品;DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Mlu I 和 Bgl II 均为美国 New England Biolabs 公司产品;Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养液及小牛血清均为美国 Gibco 公司产品;DNA-PKcs 抗体和 β -actin 抗体均为 Santa Cruze 公司产品;蛋白裂解液为 Pierce 公司产品;硝酸纤维素膜为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品;引物合成和测序均由北京三博生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 人 DNA-PKcs 启动子系列截短体的扩增

选取人宫颈癌 HeLa 细胞的基因组 DNA 作为模板,根据启动子预测软件预测的启动子序列合成引物。利用 PCR 方法扩增 DNA-PKcs 启动子系列截短体,包括 -939bp~-1bp、-939bp~-53bp、-939bp~-340bp、-647bp~-1bp、-435bp~-1bp、-152bp~-1bp、-96bp~-1bp、-96bp~-65bp、-64bp~-1bp 等区域。PCR 扩增条件为:94℃变性 5 min 后,按以下参数进行 30 个循环:94℃变性 30 s、58℃退火 30 s、72℃延伸 60 s。用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.2.2 载体的构建与测序

用限制性内切酶 Mlu I 和 Bgl II 双酶切 pGL3-basic 载体,37℃下酶切 4 h,将酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,回收载体大片段。将 PCR 产物用 Mlu I 和 Bgl II 双酶切,形成带有黏端的双链,用 T4 DNA 连接酶连接到 pGL3-basic 载体中,得到 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子的系列截短体载体,并转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选克隆,摇菌并提质粒,用 Mlu I 和 Bgl II 双酶切法鉴定,鉴定片段大小正确的质粒送相关公司测序验证。

1.2.3 细胞转染

按常规方法进行转染,用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液将人胚胎肾 293T 细胞接种于 24 孔细胞培养板中,接种量以转染时细胞密度达到 80%为宜,培养 24 h 后进行转染。将总量为 0.1~0.5 μ g 的质粒与 25 μ l 无血清、无抗生素的 DMEM 培养液混合,再将 0.5 μ l Lipofectamine™ 2000 与 25 μ l 无血清、无抗生素的 DMEM 培养液混合,然后将上述 2 种溶液轻轻混合,室温放置 20 min,加入 24 孔细胞培养板中,37℃孵箱中培养 48 h。

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测

按照试剂盒的说明书进行以下操作:①将试剂盒中 50 倍的荧光素酶测试试剂 (luciferase assay reagent, LAR) 稀释至 1 倍,每个样本加入 500 μ l;②室温下以离心半径为 8 cm、2000 r/min 离心 5 min 后,分别取 20 μ l 上清加入到 96 孔细胞培养板中;③用 1 倍的 LAR 溶液配制适量发光底物,并将 200 倍的终止液稀释至 1 倍;④将 100 μ l 发光底物加入 96 孔细胞培养板中,用 Promega 公司荧光化学发光仪读数一次,取积分值后记录;⑤加入 1 倍的终止液至步骤④的 96 孔细胞培养板中,用荧光

化学发光仪读数一次,取积分值后记录;⑥计算步骤④的积分值/步骤⑤的积分值,即为相对荧光强度值。

1.2.5 TAT对DNA-PKcs启动子活性影响的检测

将构建好的 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子(全长)载体与 pcDNA3.1-Flag-TAT 载体共转染进 293T 细胞,利用双荧光素酶报告基因系统检测 TAT 对 DNA-PKcs 启动子活性的影响;将 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子载体转染 293T 细胞 36 h 后,分别加入 4 μ g、8 μ g 和 16 μ g 的外源 TAT 作用 8 h,观察外源 TAT 对 DNA-PKcs 启动子活性的影响。

1.2.6 DNA-PKcs 启动子核心区域的鉴定

为了确定 TAT 调控 DNA-PKcs 启动子序列的核心区域,首先构建了 DNA-PKcs 启动子系列截短体的重组报告质粒载体(9 组),分别用 DNA-PKcs 启动子的不同截短体载体转染 293T 细胞,利用上述双荧光素酶报告基因系统检测 DNA-PKcs 启动子不同截短体的活性。

1.2.7 TAT对DNA-PKcs启动子不同区域活性的影响

将 DNA-PKcs 的全长启动子(-939 bp ~ -1 bp 区域)、核心启动子以及一些截短体(-152 bp ~ -1 bp、-96 bp ~ -1 bp 和 -96 bp ~ -65 bp 区域)质粒DNA 分别与 pcDNA3.1-Flag-TAT 载体共转染到 293T 细胞中,利用双荧光素酶报告基因系统检测启动子活性的变化;将 DNA-PKcs 的全长启动子、核心启动子以及一些截短体与 pcDNA3.1(-)载体共转染的 293T 细胞作为阴性对照。

1.2.8 荧光显微观察技术检测TAT的染色质松弛活性

分别将 pEGFP-Lac-TAT 或对照 pEGFP-Lac 质粒转染到 AO3_1 细胞中,采用本实验室改良建立的大规模染色质松弛技术检测 TAT 的染色质松弛活性^[8]。取出载有处理后的待检测细胞的盖玻片,首先用 4% 多聚甲醛[用磷酸缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)配制]室温固定细胞 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;用 0.2% Triton X-100 (PBS 配制)室温破膜 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;然后用 0.2 μ g/ml 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole)染核 8 min, PBS 洗 3 次,每次 10 min;最后用 10% 的甘油封片。通过在激光共聚焦显微镜下观察到的荧光点大

小来判断靶基因诱导的染色质大尺度松弛程度。

1.2.9 电离辐射对TAT参与染色体重构的影响

分别将 pEGFP-Lac-TAT 和 pEGFP-Lac 转染到 AO3_1 细胞中,转染 24 h 后,电离辐射组采用 4 Gy 的 ^{60}Co γ 射线照射,照射后 4 h 观察荧光斑点面积的大小,对照组不接受电离辐射。

2 结果

2.1 TAT抑制DNA-PKcs基因的启动子活性

将构建好的 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子(全长)载体与表达 TAT 蛋白的 pcDNA3.1-Flag-TAT 载体共转染进 293T 细胞,利用双荧光素酶报告基因系统检测 TAT 对 DNA-PKcs 启动子活性影响,结果见图 1。随着表达 TAT 的质粒 DNA 量的增加, DNA-PKcs 启动子的活性逐渐受到抑制(图 1a)。为了观察纯化的外源 TAT 蛋白对 DNA-PKcs 启动子活性的影响,将 pGL3-basic-DNA-PKcs 启动子载体转染 293T 细胞 36 h 后,分别加 4 μ g、8 μ g 和 16 μ g 的外源 TAT 蛋白作用 8 h,收集细胞检测。结果显示:随着 TAT 加入量的增加, DNA-PKcs 的启动子活性受到抑制逐渐增加(图 1b),说明加入外源性

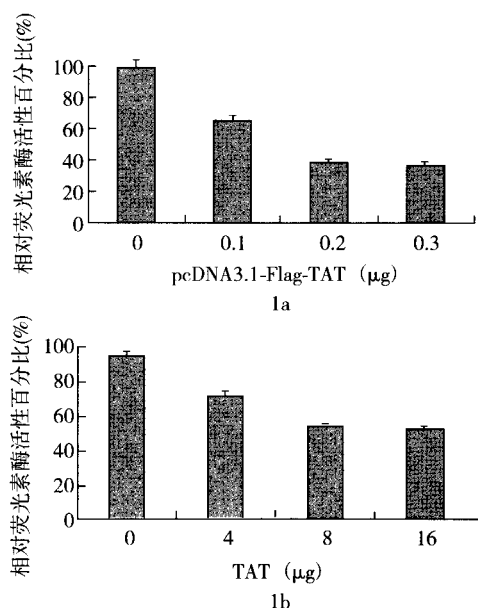


图1 不同来源 TAT 抑制 DNA-PKcs 启动子活性的结果 图 1a: 转染不同量的表达 TAT 蛋白的 pcDNA3.1-Flag-TAT 质粒对 DNA-PKcs 启动子活性的影响; 图 1b: 不同量的外源表达的 TAT 蛋白对 DNA-PKcs 启动子活性的影响。图中, TAT: 转录反式激活因子; DNA-PKcs: DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位; pcDNA3.1-Flag-TAT: 真核表达 TAT 蛋白的质粒。

TAT 同样能抑制 DNA-PKcs 的启动子活性, 将导致 DNA-PKcs 的 mRNA 水平降低。

2.2 DNA-PKcs 的核心启动子区域

凡是缺失翻译起始位点上游 -64bp~-1bp/-53bp~-1 bp 的启动子截短体(如-939bp~-53bp, -939bp~-340 bp, -96 bp~-65 bp), 其启动基因转录的活性显著降低, 而 -64 bp~-1 bp 截短体本身就具有较强的启动活性(图 2)。由此表明 -64 bp~-1 bp 区域为 DNA-PKcs 的核心启动子区域。

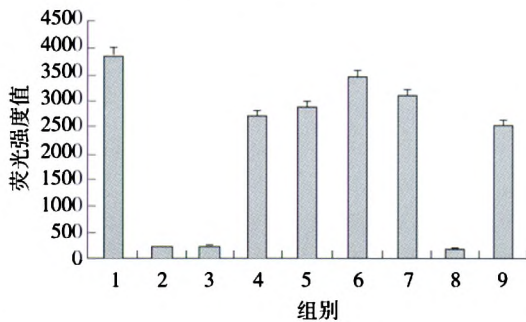


图 2 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位启动子核心区域的鉴定 图中, 1: 启动子 -939 bp~-1 bp 区域组; 2: 启动子 -939 bp~-53 bp 区域组; 3: 启动子 -939 bp~-340 bp 区域组; 4: 启动子 -647 bp~-1 bp 区域组; 5: 启动子 -435 bp~-1 bp 区域组; 6: 启动子 -152 bp~-1 bp 区域组; 7: 启动子 -96 bp~-1 bp 区域组; 8: 启动子 -96 bp~-65 bp 区域组; 9: 启动子 -64 bp~-1 bp 区域组。

2.3 TAT 能抑制 DNA-PKcs 整个启动子的活性

TAT 不仅能抑制 DNA-PKcs 启动子的核心区域, 也能抑制其非核心区域的活性。由此可知, TAT 并不只是调控 DNA-PKcs 启动子的核心序列, 而可能对 DNA-PKcs 启动子的整个序列都有影响(图 3)。

2.4 TAT 的调节大规模染色质松弛功能及电离辐射的影响

染色质松弛是基因转录和 DNA 修复等所必须的, TAT 是否通过影响大规模的染色体重构来调节 DNA-PKcs 的启动子活性? 本研究通过 AO3_1 染色体重构模型来分析 TAT 对染色体重构的影响^[8], 并观察了 TAT 具有大规模染色质松弛作用, 且电离辐射对 TAT 的这种染色体重构功能具有抑制作用。如图 4 所示, 与对照组 pEGFP-Lac 比较, pEGFP-Lac-TAT 组的荧光斑点面积明显要大, 而电离辐射在一定程度上抑制了 TAT 参与的染色体重构。

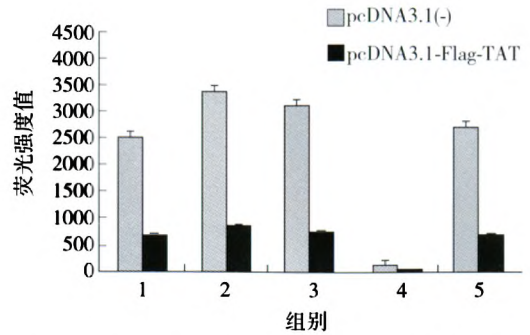


图 3 TAT 抑制 DNA-PKcs 启动子的不同区域的活性 图中, 1: 启动子 -939 bp~-1bp 区域组; 2: 启动子 -152bp~-1bp 区域组; 3: 启动子 -96 bp~-1bp 区域组; 4: 启动子 -96 bp~-65 bp 区域组; 5: 启动子 -64 bp~-1bp 区域组。图中, TAT: 转录反式激活因子; DNA-PKcs: DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位; pcDNA3.1-Flag-TAT: 真核表达 TAT 蛋白的质粒。

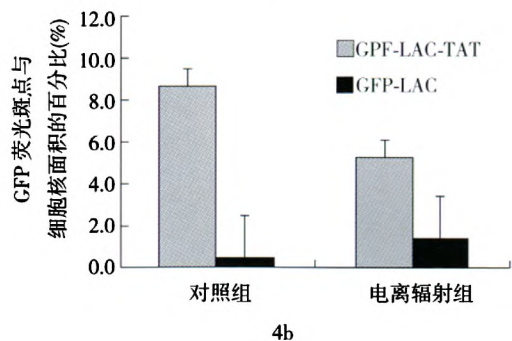
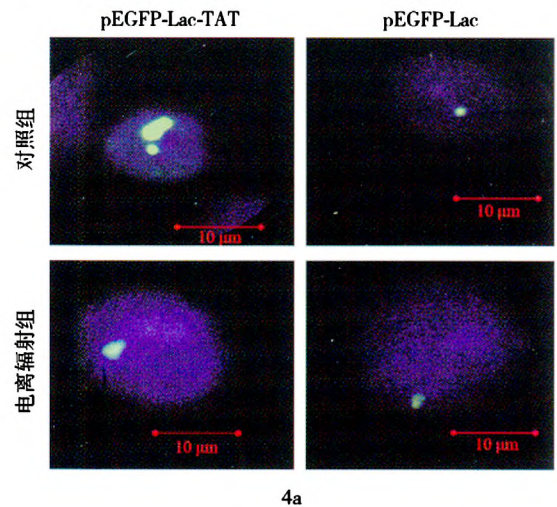


图 4 电离辐射对 TAT 的染色体重构功能的影响 图 4a: pEGFP-Lac-TAT 参与 AO3_1 细胞电离辐射前后的染色体重构; 图 4b: pEGFP-Lac-TAT 参与 AO3_1 细胞电离辐射前后染色体重构相应的统计图。图中, TAT: 转录反式激活因子; pEGFP-Lac-TAT 和 pEGFP-Lac: 分别为用于染色质重构分析的质粒及对照质粒; GFP: 绿色荧光蛋白。

3 讨论

近年来研究发现, 获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 诱导的肿瘤患者对放射治疗的敏感性与普通的肿瘤患者有很大的差异, 如 AIDS 高发生率的 Kaposi 肉瘤患者, 无论是其肉瘤组织还是正常黏膜组织, 放疗后产生的细胞毒性反应明显高于非 AIDS 的普通肿瘤患者, AIDS 诱导的肿瘤患者对放疗的敏感性很可能与 DNA 修复因子功能的缺失有关。DNA-PKcs 是 DNA 双链断裂的关键修复因子, 它的活性与机体的放射敏感性有关。

本实验室以往的实验结果显示, TAT 能在 mRNA 水平和蛋白水平上抑制 DNA-PKcs 的表达, 从而导致细胞对电离辐射的敏感性增加。本研究进一步探索了 TAT 是如何在转录水平上调控 DNA-PKcs 的表达。本研究通过构建 DNA-PKcs 启动子的系列截短体, 经报告基因分析, 无论是共转染 TAT 基因还是加入外源的 TAT 蛋白都能明显地抑制启动子的活性。本研究将启动子截断成不同的区域, 找到了 DNA-PKcs 的核心启动子序列(-64bp~-1 bp 区域), 并将这些启动子不同截短体的报告基因转到细胞中, 通过报告基因分析, TAT 蛋白不仅能抑制 DNA-PKcs 的核心启动序列, 而且对每个启动序列的活性都有明显的抑制作用。DNA-PKcs 的核心启动序列中含有结合转录因子核因子- κ B 和转录因子 SP1 的序列, 但其启动子序列中缺少 TATA 盒^[9], HIV-1 的长末端重复序列中也含有类似的结合转录因子核因子- κ B 和 SP1 的结合序列^[10], 为什么 TAT 能激活 HIV-1 的长末端重复序列活性, 反而抑制了具有类似序列的 DNA-PKcs 启动子的活性呢? 研究表明, TAT 并不是简单地调控某个转录因子来调节 DNA-PKcs 的启动子序列, TAT 还具有大规模的染色体松弛活性, 此活性可能也参与基因转录调节作用。DNA 与组蛋白八聚体组成了核小体, 基因

转录是必须通过染色体重构来使核小体的结构打开, 让一些转录因子能够结合到基因的启动序列中, 从而促使基因的转录。我们通过染色体重构的模型证实了 TAT 能够参与到染色体重构中, 并证实了电离辐射能够抑制 TAT 参与染色体重构。本研究为了解 AIDS 的发病机理及其合并肿瘤患者对放射治疗的敏感性提供了重要信息。

参 考 文 献

- [1] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, 2001, 276(8): 5836-5840.
- [2] Aoki Y, Tosato G. HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) infectivity. *Blood*, 2004, 104(3): 810-814.
- [3] Cantaluppi V, Biancone L, Boccellino M, et al. HIV type 1 Tat protein is a survival factor for Kaposi's sarcoma and endothelial cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17(10): 965-976.
- [4] Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*, 1999, 13(8): 916-934.
- [5] Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, et al. DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(6): 3758-3763.
- [6] Park SJ, Oh EJ, Yoo MA, et al. Involvement of DNA-dependent protein kinase in regulation of stress-induced JNK activation. *DNA Cell Biol*, 2001, 20(10): 637-645.
- [7] Sun Y, Huang YC, Xu QZ, et al. HIV-1 Tat depresses DNA-PK(CS) expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65(3): 842-850.
- [8] 秦夏, 张士猛, 徐勤枝, 等. 一种基于 GFP 分子荧光显示的检测大尺度染色质松弛技术的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(6): 558-562.
- [9] Connelly MA, Zhang H, Kieleczawa J, et al. The promoters for human DNA-PKcs (PRKDC) and MCM4: divergently transcribed genes located at chromosome 8 band q11. *Genomics*, 1998, 47(1): 71-83.
- [10] Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem*, 1999, 274(41): 28837-28840.

(收稿日期: 2011-05-20)