

國立台灣大學生命科學院生化科學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

PHRF1 參與 DNA 損害反應

PHRF1 in DNA damage response

龔彥宇

Yen-Yu Gong

指導教授：張茂山 博士

Advisor : Mau-Sun Chang, Ph.D.

中華民國一百零二年七月

July, 2013

中文摘要

當細胞受到外在環境的刺激進而影響到基因體的完整性時，細胞內會有許多的反應，例如細胞週期的調控，轉錄作用的調控，DNA 修補作用，或是細胞凋亡，其目的是避免基因體的完整性遭到破壞，稱之為 DNA 損害反應。DNA 損害反應中，ATM 和 ATR 扮演重要的角色，Matsuoka 等人利用可辨識 ATM 和 ATR 受質的抗體進行免疫沉澱後將所獲得的樣品進行質譜儀分析，發現有七百多種蛋白質會被 ATM 和 ATR 磷酸化，PHRF1 被發現是 ATM 和 ATR 磷酸化的受質，但功能未知。

我們的研究以 PHRF1 為核心，根據胺基酸分析，PHRF1 上有許多重要的蛋白質功能區域，包含 PHD domain、Ring finger、SQ/TQ cluster domain。以這些資訊為出發點，我們想了解 PHRF1 在 DNA 損害反應中所扮演的角色。免疫螢光染色結果顯示 PHRF1 是一個核蛋白；當細胞遭受基因毒性壓力時，PHRF1 會從細胞核質移動到染色質，而將內生性缺乏 ATM 表現的細胞株進行細胞分層萃取，發現 PHRF1 受到基因毒性壓力後由核質到染色質的移動能力消失，因此 ATM 對 PHRF1 磷酸化會調控 PHRF1 移動到染色質的能力。

在 2011 年，Fnu 等人發現 H3K36me2 會促進非同源末端黏合 (non-homologous end-joining, NHEJ)。藉由免疫沉澱，PHRF1 分別可以跟 H3K36me2、Nbs1 及 Ku70 交互作用，而末端黏合實驗更進一步證實 PHRF1 可以影響 NHEJ，因此我提出假說認為 PHRF1 是連接 H3K36me2 和 Nbs1 及 Ku70 調控細胞在 DNA 斷裂時負責非同源末端黏合修補。

關鍵字：PHRF1，ATM，H3K36me2，Nbs1，NHEJ

英文摘要

The role of histone methylation in double-strand break repair by non-homologous end-joining (NHEJ) is not well defined. Previous studies indicate that H3K36me2 links Nbs1 and Ku70 to promote NHEJ, but which protein is responsible for this connection is unknown.

Human PHRF1/KIAA1542 contains a plant homeodomain (PHD), a putative methylated histone binding domain, and is identified as a phosphorylation substrate of ATM/ATR kinase. However, very little is known about its function in DNA damage response. Immunofluorescence and subcellular fractionation results revealed that PHRF1 mainly localized in the nucleus prior to genotoxic stress, but PHRF1 increased onto chromatin upon DNA damage in an ATM-dependent manner. Immunoprecipitation suggested that PHRF1, Nbs1, Ku70, and dimethylated H3K36 (H3K36me2) were in the same immunocomplex.

In vivo end-joining assay using a linearized luciferase reporter suggested that end-joining efficiency was decreased in PHRF1 knockdown HEK293 cells but significantly increased in PHRF1 overexpressing U2OS cells, suggesting that the presence of PHRF1 may link H3K36 methylation to non-homologous end joining by interaction with Nbs1 and Ku70.

Keywords : PHRF1 , ATM , H3K36me2 , Nbs1 , NHEJ

縮寫表



APS: ammonium persulfate

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

CE: cytosolic extract

Chr: chromatin

CPT: camptothecin

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco modified Eagle's medium

DTT: dithiothreitol

ECL: electrochemiluminescence

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

HEK293: human embryonic kidney 293

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP: horse reddish peroxidase

IB: immunoblotting

IP: immunoprecipitation

MEM/EBSS: minimum essential medium with earle's balanced salts

MG132: N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal Z-Leu-Leu-Leu-al

Mre11: meiotic recombination 11

MRN complex: Mre11-Rad50-Nbs1 complex

Nbs1: Nijmegen breakage syndrome 1

NE: nuclear extract

NHEJ: non-homologous end joining

PBS: phosphate-buffered saline

PFA: paraformaldehyde

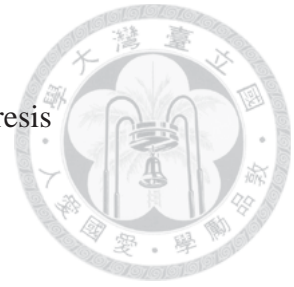
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TBS: Tris buffered saline

TBST: Tris buffered saline with 0.1% Tween-20

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

WCE: whole cell extract

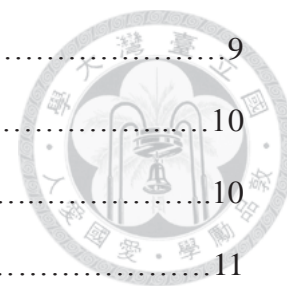


目錄



中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
縮寫表.....	iii
目錄.....	v
第一章 前言.....	1
1.1 DNA 損害反應 (DNA damage response)	1
1.2 細胞週期的調控.....	1
1.3 DNA 修補反應.....	1
1.3.1 同源重組 (Homologous recombination, HR)	2
1.3.2 非同源末端黏合 (Non-homologous end-joining, NHEJ)	2
1.4 PHRF1/KIAA1542 (PHD and ring finger domains 1)	3
1.5 研究動機.....	3
第二章 材料與方法.....	4
2.1.1 細胞株培養.....	4
2.1.2 細胞計數.....	4
2.1.3 加藥處理.....	4
2.2.1 細胞蛋白質萃取 (Whole cell extract).....	5
2.2.2 細胞分層萃取 (Fractionation).....	5
2.3 免疫沉澱.....	6
2.4 免疫螢光染色.....	6
2.5.1 基因轉染.....	7
2.5.2 大量表現細胞株建立.....	7
2.5.3 少量表現細胞株建立.....	8
2.5.4 <i>In vivo</i> ubiquitination assay.....	8

2.6.1 SDS-PAGE 膠體電泳.....	9
2.6.2 西方墨點法.....	10
2.7 末端黏合檢驗(End joining assay).....	10
第三章 實驗結果.....	11
3.1 PHRF1 蛋白質的表現大小.....	11
3.2 PHRF1 在細胞內的分布.....	11
3.3 PHRF1 受到 genotoxic stress 會結合到染色質.....	11
3.4 PHRF1 可和組蛋白交互作用.....	12
3.5 PHRF1 的 SCD domain 使其具備移動能力.....	12
3.6 ATM 可以促進 PHRF1 的移動.....	13
3.7 PHRF1 可以和 Nbs1 交互作用.....	13
3.8 PHRF1 可以影響末端黏合的效率.....	13
第四章 總結與討論.....	14
第五章 實驗結果圖表.....	17
附錄.....	26
參考文獻.....	30



第一章 前言



1.1 DNA 損害反應 (DNA damage response)


當去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 在複製時，或者是受到某些物理或化學因子的影響，使其結構發生改變，這些改變若是沒有被細胞發現而修正，那麼將導致遺傳訊息的改變，其結果可能影響生命體的細胞功能，甚至導致生命體的死亡。因此，對於此現象細胞發展出一套系統，可以在正確的時間，正確的地點，進行適當的修補，以確保這些遺傳訊息可以完整地保留。從基因體的結構被影響，細胞內感應到，並且將之修補的過程，稱之為 DNA 損害反應。DNA 損害反應中，改變了細胞的生理功能，包含：細胞週期的調控，轉錄作用的調控，免疫反應，DNA 修補反應，以及細胞凋亡(Zhou & Elledge, 2000)。

1.2 DNA 修補反應

生命體受到內生性或是外在環境的影響，基因體會受到結構上的改變，DNA 修補反應則是避免基因體結構的改變，倘若 DNA 修補反應沒有正確的進行，則生命體的基因體將會產生不可逆的永久改變，稱之為突變 (mutation)，這些突變可能使的生物體某些生理功能衰退，消失，細胞老化，甚至導致癌症(cancer)，因此當細胞遭受基因毒性壓力後，這些 DNA 修補反應是非常重要的。DNA 損害中，以 DNA 的雙股斷裂最為嚴重，細胞為了修補 DNA 的雙股斷裂，發展出了兩大類系統：非同源末端黏合 (Non-homologous end-joining, NHEJ) 以及同源重組 (Homologous recombination, HR)。

1.2.1 早期 DNA 損害反應

當 DNA 雙股斷裂時，會被 Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex 辨識，並且進一步活化 ATM，使細胞進行同源重組來修復 DNA 的雙股斷裂(Williams, Williams, & Tainer, 2007)。



RAD50 是屬於 SMC 家族的蛋白質，具備了 ATPase 的活性，並且可以和 MRE11 交互作用並且結合於雙股斷裂的 DNA 末端(Williams *et al.*, 2007)。MRE11 具備了內切酶 (Endonuclease) 與外切酶 (Exonuclease) 的功能，負責將 DNA 雙股斷裂處的 DNA 進行適當的剪裁，以利於之後同源重組的進行(Williams *et al.*, 2007)。NBS1 可以與 MRE11 結合，並且與 ATM 產生蛋白-蛋白交互作用，這可以將 ATM 召集到 DNA 雙股斷裂處，並將 ATM 由不活化的型態轉變成活化的型態(Jazayeri, Balestrini, Garner, Haber, & Costanzo, 2008; Kanaar & Wyman, 2008; Lee & Paull, 2005)。

1.2.2 非同源末端黏合 (Non-homologous end-joining, NHEJ)

非同源末端黏合修復機制與同源重組最大的差異，就在於完全不需要任何模板的幫助，此一機制的修復蛋白可以直接將雙股裂斷的末端彼此拉近，再藉由 DNA 黏合酶 (ligase) 的幫助下，將斷裂的兩股重新接合。

當 DNA 產生雙股斷裂時，斷裂處會很快的被 Ku 異型合子(Ku heterodimer, Ku70 and Ku80) 結合(Mahaney, Meek, & Lees-Miller, 2009)，當 Ku 結合到 DNA 雙股斷裂處，影響 DNA 末端修飾(Roberts *et al.*, 2010)，並活化 DNA-PK 的催化次單元 (catalytic subunit of DNA-PK, DNA-PKcs) 進一步引發非同源末端黏合修補反應(Mahaney *et al.*, 2009)。

在非同源末端黏合反應中，DNA-PK 扮演了非常重要的角色，它可以藉由磷酸化許多的蛋白質，保護 DNA 雙股斷裂處 (DNA-PKcs 自身進行磷酸化反應，(Meek, Dang, & Lees-Miller, 2008))，和進行適當的 DNA 末端修飾 (對末端修飾酵素，ARTEMIS，進行磷酸化，(Meek *et al.*, 2008))。當 DNA-PKcs 定位之後，XRCC4/LIG4 則會被召集到 DNA 雙股斷裂處，將斷裂的雙股 DNA 進行黏合反應(Mahaney *et al.*, 2009)。另外，ATM 也可以經由 ARTEMIS 的途徑進行非同源末端黏合，佔了大約 10%的比例(Jeggo & Lobrich, 2005)。

1.3 PHRF1/KIAA1542 (PHD and ring finger domains 1)

PHRF1 是一個全長 1649 個胺基酸的蛋白質，在結構上具備了 Ring finger domain (a.a. 107-152)，PHD domain (a.a. 185-233)，以及 SCD domain (a.a. 925-1649) 三個功能區域，Matsuoka 等人利用可辨識 ATM 和 ATR 受質的抗體進行免疫沉澱後發現了七百多種蛋白質在 DNA 損害反應中，會受到 ATM 和 ATR 磷酸化(Matsuoka et al., 2007)。其中，PHRF1 所具備的功能區域具有非常重要的生物功能，Ring finger domain 被發現在泛素化 (Ubiquitination) 反應中扮演 E3 (Ubiquitin ligase) 將泛素 (Ubiquitin) 從 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) 轉移到目標受質的角色，被泛素化的目標蛋白會被細胞分解(Hershko & Ciechanover, 1986)，或是改變原本的生物功能(Deng *et al.*, 2000)。PHD domain 被報導可以結合甲基化的組蛋白 (methylated histone)，這些交互作用改變了染色體的結構，進一步調控細胞內基因的表現(Mellor, 2006)。SCD (SQ/TQ cluster domain) 的絲氨酸或是蘇胺酸則是會被 ATM 和 ATR 加上磷酸根的功能區域。被 ATM/ATR 活化的蛋白質將更廣泛的去調控其他的蛋白質活性，影響細胞週期，轉錄作用，細胞凋亡等(Zhou & Elledge, 2000)。

1.5 研究動機

DNA 損害反應是生物體非常重要的功能，如果沒有辦法受到良好的調控會對生命體造成許多危害。ATM 和 ATR 已經被公認為是 DNA 損害反應中非常重要的兩大蛋白質磷酸激酶，但是 ATM 和 ATR 是如何影響下游蛋白，以及下游蛋白是如何的交互作用進而產生細胞反應，目前所知甚少。PHRF1 為 ATM/ATR 所調控的其中一個蛋白質，而且具備了非常多重要的蛋白質功能區域，影響的層面非常廣泛，因此我們對 PHRF1 產生了研究興趣，想了解 PHRF1 在 DNA 損害反應中所扮演的角色。

第二章 材料與方法



2.1.1 細胞株培養

HeLa 和 HEK293T 細胞以外加 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、1% 抗生素 (Antibiotic/Antimycotic solution, Thermo scientific) 的 DMEM (Thermo scientific) 培養。U2OS 細胞培養於外加 10% 胎牛血清、1% 抗生素的 McCoy's 5A 培養液。Ataxia-telangiectasia fibroblast simian virus 40 細胞以 MEM/EBSS (Thermo scientific) 培養，外加 0.1 mM 非必需氨基酸 (non-essential amino acids)、1.5 g/L 碳酸氫鈉、1 mM 丙酮酸鈉、10% 胎牛血清和 1% 抗生素。細胞株培養於 37°C、5% 二氧化碳培養箱，每二至三天更換新的培養液。待細胞全滿，將培養液吸出，先以 PBS (GIBCO®) 清洗，加入 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO®)，37°C 培養箱作用五分鐘，輕拍培養皿使細胞懸浮後加入 5 毫升的 PBS，吸取至 15 毫升離心管，以 1,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液並加入適量培養液，充份打散後分配到適當容器。

2.1.2 細胞計數

如同前述收取貼附細胞，離心下來的細胞加入適量培養液後，取 100 μ l 的細胞懸浮液加 300 μ l 的 PBS 稀釋為原始濃度的 1/4，取 20 μ l 加到細胞計數器，計算顯微視野下，細胞計數器九宮格中的四格細胞數目總共為 n，則細胞懸浮液的濃度為 $n \times 10^4$ /ml，依此來計算應該取多少細胞懸浮液達到相對應的細胞數量。

2.1.3 加藥處理

camptothecin (CPT) 和 N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) (Sigma Aldrich®) 的原液先以 dimethyl sulfoxide (DMSO) 稀釋後，加入 15 毫升離心管與適當量培養液充分混合至如結果所示濃度。對照組與穩定過表現 PHRF1 的 HEK293T 細胞以 6×10^5 個細胞數培養於 6 公分培

養皿，給予 2 天貼附生長後，萃取細胞蛋白質。轉染過的 HEK293T 細胞，換上含有 MG132 的培養液培養 16 小時後，萃取細胞蛋白質。

2.2.1 細胞蛋白質萃取 (Whole cell extract)

細胞以 PBS 清洗過後，加入適量 0.25% Trypsin-EDTA，作用後使細胞懸浮，加入適量 PBS 以 2,500 rpm 離心收取細胞，再加入適量 AL 萃取液。或是細胞以 PBS 清洗過後，直接加入 AL 萃取液，將細胞與萃取液一起刮下來。冰上作用 15 至 30 分鐘後，以超音波進行處理 (amplitude: 60, pulse on: 1 min×3、pulse off: 20 sec×2)，處理後以 13,000 rpm 離心 15 分鐘收取上清液，放在 -20°C 加以保存。AL 萃取液成分：1% Triton X-100，1% NP-40，150 mM NaCl，25 mM Tris-HCl，1% protease inhibitor cocktail，1% phosphatase inhibitor，5% Glycerol，pH 7.5。

2.2.2 細胞分層萃取 (Fractionation)

染色質分離方法來自前人研究所述 (Mendez & Stillman, 2000)。簡述如下，將約 2×10^6 個細胞培養於 6 公分培養皿，以 Trypsin 處理收取貼附細胞如前面所述，加入 150 μ l Buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M Sucrose, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 1% Protease Inhibitor cocktail)，輕拍均勻後放在冰上 5 分鐘，以 2,000 g 於 4°C 離心 5 分鐘後將細胞核沉澱，細胞質蛋白萃取則在上清液 (CE)。收取下來的細胞核以 Buffer A 200 μ l 清洗兩次後，加入 150 μ l 的 Buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% Protease Inhibitor cocktail)，輕拍均勻後放在冰上 30 分鐘，以 10,000 g 於 4°C 離心 5 分鐘分離核質和染色質，上清液為核質蛋白質萃取 (NE)，沉澱以 200 μ l Buffer B 清洗兩次後，加入 250 μ l 的 1×SDS sample buffer (5×SDS sample buffer 配方：0.225 M Tris-HCl, 50% Glycerol, 5% SDS, 0.05% Bromophenol Blue, 0.25 M DTT，使用前以去離子水稀釋 5 倍)，震盪後以超音波處理 (40 W, Pulse on: 1 min×3, Pulse off: 20 sec×2)，澄清後以 100°C 加熱 5 分鐘，則染色質蛋白以 1,3000 rpm 於 4°C 離心 15 分鐘，收取上清液(chromatin)獲得。樣本皆保存於 -20°C。



2.3 免疫沉澱

細胞蛋白質萃取如同前述。anti-HA agarose beads (Sigma-Aldrich[®]) 先以 1 毫升 PBS 洗過三次，以 6,000 rpm 將 beads 離心下來，加入等體積的 PBS 後打散 Beads，取 20 μ l 的混和液加入到適量的細胞蛋白質萃取液，放在 4°C 翻轉隔夜，以 1 毫升 Lysis buffer 清洗 beads，第一次置於 4°C 翻轉 15 分鐘，第二次到第四次置於 4°C 各翻轉 5 分鐘，中間以 6,000 rpm 2 分鐘將 beads 離心下來，最後一次以 7,000 rpm 3 分鐘將 beads 離心下來，充份去除上清液，加入 50 μ l 的 2 \times SDS sample buffer (由 5 \times SDS sample buffer 稀釋)，放在 100°C 加熱 3 分鐘，震盪後以 7,000 rpm 將 beads 離心 3 分鐘，取出上清液置於 -20°C 保存。

Protein A 和 Protein G beads (Sigma-Aldrich[®]) 先泡在 PBS 中至少 30 分鐘膨脹後，與 anti-HA agarose beads 同樣的方式處理。先取 Protein A 10 μ l 與 Protein G 10 μ l 加入細胞蛋白質萃取液，置於 4°C 翻轉 1 小時進行 Pre-clearing，以 6,000 rpm 離心 3 分鐘去除 beads 後，取 10 μ l anti-Flag (Sigma-Aldrich[®]) 加入適量的細胞蛋白質萃取液，置於 4°C 翻轉隔夜，加入 Protein A 20 μ l 與 Protein G 10 μ l 繼續翻轉 2 至 3 小時後，以與 anti-HA agarose beads 同樣方式清洗 beads 後，加入 2 \times SDS sample buffer 並加熱收取樣本。

2.4 免疫螢光染色

細胞以適量培養於含有蓋玻片的六孔盤，以 PBS 清洗過後，加入含有 4% Paraformaldehyde 的 PBS (pH=7.0) 於室溫中固定細胞，15 分鐘後以 PBS 清洗 5 分鐘一次，加入含有 0.5% Triton X-100 的 PBS 在室溫進行 permeabilization 10 分鐘，以 PBS 清洗 5 分鐘三次後，加入 blocking solution (3% FBS in PBS) 於 37°C 反應 30 分鐘，小心取出蓋玻片放在 parafilm 上，加入一級抗體 (以 PBS 稀釋為 1:200-300) 在 37°C 反應 40 分鐘，以 PBS 清洗 5 分鐘二次後，加入針對一次抗體且含有螢光基團的二級抗體 (Dylight 或 Rhodamine, 以 PBS 稀釋為 1:200-300)

在 37°C 反應 40 分鐘，以 PBS 清洗五分鐘二次後，以去離子水浸潤 5 分鐘一次，加入含有 DAPI 的去離子水 (1:10000 稀釋) 室溫避光反應 2 分鐘，以去離子水清洗 5 分鐘二次後，小心取出蓋玻片，以拭鏡紙從蓋玻片邊緣吸掉多餘液體，蓋上滴有封片膠的載玻片，陰乾後以螢光顯微鏡觀察 (Lieca)。

2.5.1 基因轉染

按照 SuperFect[®] Transfection Reagent (QIAGEN[®]) 的建議步驟進行。簡述如下，將 1.3×10^6 的細胞數培養於 6 公分培養皿，表現蛋白的質體 DNA 與 transfection reagent 以 1:4 ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) 混合於 150 μl 不含血清、不含抗生素的培養液，靜置 10 分鐘後，加入 1 毫升含有血清的培養液充份混合後，加入到培養皿並培養 3 小時後，換回正常培養液繼續培養。

2.5.2 大量表現細胞株建立

以 HeLa 與 U2OS 細胞建立大量表現 PHRF1 的 stable clone。將 HEK293T 細胞以 4×10^5 的細胞數培養於 6 孔盤。含有 N 端 HA-tag 的 PHRF1 cDNA 接在 pLenti6/v5-D-TOPO vector (Invitrogen)，建立基因轉染載體 pLenti6/v5-HA-PHRF1。將 package vector pCMV Δ R8.91、VSV-G vector pMD.G、pLenti6/v5-HA-PHRF1，以 pCMV Δ R8.91:pMD.G:pLenti6/v5-HA-PHRF1=5:1:5 (μg) 的比例轉染 HEK293T 細胞，換上正常培養液培養兩天後，將含有病毒的培養液先以 1,500 rpm 離心 10 分鐘去除懸浮細胞與碎片，將澄清的上清液換到新的 eppendorf 後，以 30,000 g 於 4°C 離心 2 小時，將上清液吸出，只保留底部約 100 μl ，置於冰上 1 小時，每 10 分鐘輕拍 eppendorf，之後，加入含有 polybrene (Sigma-Aldrich[®])，最終濃度 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培養液約 900 μl 。將 HeLa 和 U2OS 細胞以 3×10^5 的細胞數培養於 6 孔盤，加入含有病毒與 polybrene 的培養液，培養 2 天後以 Trypsin 懸浮轉培養於 10 公分培養皿，隔日換上含有 Blasticidin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培養液進行抗藥性篩選約 7 到 10 天，之後以 10 μl tip 挑取細胞群落，加入 1 毫升的 PBS 稀釋，取

適量加到 24 孔盤，於次日繼續以含有 Blasticidin 的培養液培養，之後以免疫螢光染色挑選表現百分比最高的 clone。

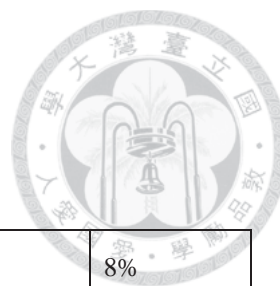


2.5.3 少量表現細胞株建立

以 HEK293T 細胞建立少量表現 PHRF1 的 stable clone。將 HEK293T 細胞以 4×10^5 的細胞數培養於 6 孔盤。將 package vector pCMV Δ R8.91、VSV-G vector pMD.G、p-sh-PHRF1 質體 DNA，以 pCMV Δ R8.91 : pMD.G : p-sh-PHRF1 質體 DNA=5 : 1 : 5 (μ g) 的比例轉染 HEK293T 細胞，換上正常培養液培養兩天後，將含有病毒的培養液先以 1,500 rpm 離心 10 分鐘去除懸浮細胞與碎片，將澄清的上清液換到新的 eppendorf 後，以 30,000 g 於 4°C 離心 2 小時，將上清液吸出，只保留底部約 100 μ l，置於冰上 1 小時，每 10 分鐘輕拍 eppendorf，之後，加入含有 polybrene (Sigma-Aldrich[®]，最終濃度 4 μ g/ml) 的培養液約 900 μ l。將 HEK293T 細胞以 3×10^5 的細胞數培養於 6 孔盤，加入含有病毒與 polybrene 的培養液，培養 2 天後以 Trypsin 懸浮轉培養於 10 公分培養皿，隔日換上含有 Puromycine (5 μ g/ml) 的培養液進行抗藥性篩選約 7 到 10 天，之後以 10 μ l tip 挑取細胞群落，加入 1 毫升的 PBS 稀釋，取適量加到 24 孔盤，於次日繼續以含有 Puromycine 的培養液培養，之後以免疫螢光染色跟西方墨點法挑選表現百分比最少的 clone。

2.5.4 *In vivo* ubiquitination assay

將 HEK293T 以 1.3×10^6 的細胞數培養於 6 公分培養皿，於隔日轉染 Flag-tag Ubiquitin 的質體 DNA (每一盤加入 2 μ g)，24 小時後轉染 HA-tag PHRF1 的質體 DNA (每一盤加入 5 μ g)，48 小時後以含有 MG132 (proteasome inhibitor) 的培養液培養 16 小時，收取全細胞蛋白質萃取，分別用 anti-HA 或 anti-Flag 免疫沉澱收取表現的 Ubiquitin 或 PHRF1，接著跑 SDS/PAGE 後以西方式墨點法 (anti-Flag and anti-HA) 觀察兩者結合程度的改變。



2.6.1 SDS-PAGE 膠體電泳

製作二片電泳膠體（下層膠，Running gel）的配方如下：

Percentage	6%	8%
ddH ₂ O	5.3 (ml)	4.6 (ml)
30% Acryamide/bis-acryamide solution	2.0	2.7
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	2.5
10% SDS	0.1	0.1
10% ammonium persulfate	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.006

上述配方加入注膠器後，以 Isopropanol 壓平液面。膠凝結後，倒掉並以去離子水清洗、吸水紙吸乾後加入上層膠與插上齒梳。上層膠 (Stacking gel) 配方如下：

ddH ₂ O	0.68 (ml)
30% Acryamide/bis-acryamide solution	0.17
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.13
10% SDS	0.01
10% ammonium persulfate	0.01
TEMED	0.001

上層膠凝結以後，架設電泳槽、拔掉齒梳，以去離子水沖洗去除殘餘膠體，加入 SDS-Running Buffer，加入含有 sample buffer 的蛋白質樣品與 marker，先以固定電壓 70 伏特跑到 marker 與蛋白質樣品都進入下層膠，轉為 200 伏特約 30 至 40 分鐘後取下膠體。

10×SDS-Running buffer 配方法下：30.2g Tris，187g Glycine，100ml 20% SDS，加入去離子水至 1 公升，充份溶解後稀釋為 1×SDS-Running buffer。



2.6.2 西方墨點法

將上述 SDS-PAGE 的膠體取下後，取出轉印膜 (Nitrocellulose membrane)，先浸泡轉印溶液 (1×Transfer buffer 配方：3.03 g Tris，14.4 g Glycine，150 ml 甲醇，加入去離子水至 1 公升)，貼附到膠體，架設轉印三明治，以負極—海綿—吸水紙—SDS-PAGE—轉印膜—吸水紙—海綿—正極的順序置放於轉印電泳槽，固定電流在 300 毫安培，轉印 3 小時後取出轉印膜，浸泡於含有 5% 脫脂奶粉的 TBST，於 4°C 進行 Blocking 隔夜反應。接著換上含有抗體的 5% Skim milk in TBST 作用 90 分鐘，抗體稀釋倍數依據抗體特性從 1：1000~1：15000 不等，作用完後，以 TBST 清洗轉印膜三次，每次五分鐘，接著換上含有二級抗體的 5% Skim milk in TBST 作用 75 分鐘，結束後以 TBST 清洗轉印膜三次，每次五分鐘，最後再以 TBS 清洗 5 分鐘後，將轉印膜夾出並均勻滴上現配的 ECL (Millipore™)，放入壓片夾，去除多餘的 ECL 液體，至暗房壓片。

2.7 末端黏合檢驗 (End joining assay)

將表現載體接上 Luciferase cDNA，並且利用限制酵素使得載體被切割成線形，結果將會影響 Luciferase 的正常表現。將該載體轉染欲觀察的細胞 (我們採用的細胞有內生性大量表現 PHRF1 的細胞株 U2OS Lenti-PHRF1#1，U2OS Lenti-PHRF1#2，內生性少量表現 PHRF1 的細胞株 sh-PHRF1#1 HEK293T 細胞，sh-PHRF1#2 HEK293T 細胞，sh-scramble HEK293T 細胞，pLenti-6/V5 U2OS 細胞)，細胞對於雙股斷裂的 DNA 會啟動 DNA 修補機制，將斷掉的雙股 DNA 接回原本的環狀質體，此時質體又具備了表現 Luciferase 的能力，我們只要藉由偵測 Luciferase 所發出來的冷光，跟適當的控制組做比對，便可以分析該細胞進行非同源末端黏合反應的效率。

第三章 實驗結果



3.1 PHRF1 蛋白質的大小

PHRF1 由 1649 個胺基酸組成，從 cDNA 序列預測大小約為 178 kDa (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>)。為了了解 PHRF1 在人類細胞株的表現，我們利用在大腸桿菌表現的 PHRF1 重組蛋白(a.a 1297-1649)，製備了抗 PHRF1 的小鼠單株抗體，再準備 HeLa 細胞的全細胞蛋白質萃取液，進行西方墨點法分析，結果發現 PHRF1 蛋白主要表現位置約為 160 kDa(圖一)，與預測值相近。

3.2 PHRF1 在細胞內的分布

為了瞭解 PHRF1 在細胞內的分布，我們對 HeLa 細胞進行免疫螢光染色，發現內生性 PHRF1 主要分布在細胞核；同時，我們構築了 HA-tag PHRF1 和 GFP-tag PHRF1 的表現質體，將質體轉染 HEK293T 細胞，利用免疫螢光染色觀察，同樣地也可以發現重組蛋白 HA-PHRF1 以及 GFP-PHRF1 是在細胞核內表現(圖二)，綜合以上結果顯示 PHRF1 為一個核蛋白。

3.3 PHRF1 受到基因毒性壓力後會增加出現在染色質的數量

利用細胞分層萃取的技術，分別取出細胞質萃取液(CE)，細胞核質萃取液(NE)，以及染色質萃取液(Chr)。透過西方墨點法分析，發現 PHRF1 主要分布於細胞核質萃取液，並有少量分布在染色質萃取液。Camptothecin 會對細胞產生基因毒性壓力，並造成 DNA 雙股斷裂，利用細胞分層萃取的技術，透過西方墨點法分析，發現細胞受到基因毒性壓力後，PHRF1 會從細胞核質移動到染色質(圖三)。

3.4 ATM 可以促進 PHRF1 的移動

根據 Matsuoka *et al.* 2007 年的報導指出，細胞遭受到電磁輻射後，PHRF1 會被 ATM/ATR 磷酸化，其中有兩個磷酸化的位置藉由質譜儀分析出來，分別是 S925 跟 S1389。因此我們推測 PHRF1 在遭受基因毒性壓力被 ATM/ATR 磷酸化後，才會從細胞核質移動到染色質，為了回答這個問題，我們利用缺乏內生性 ATM 表現的細胞株，先用 CPT 處理後，再進行細胞分層萃取實驗。西方墨點法結果顯示，缺乏內生性 ATM 表現的細胞不管有無 CPT 處理，染色質萃取層都無法發現 PHRF1 的存在 (圖四 A)，這結果暗示 ATM 影響 PHRF1 由細胞核質移動到染色質的能力。為了進一步加強這個推論，我們把 HeLa 細胞先處理 ATM inhibitor (KU55933) (Hickson *et al.*, 2004)，然後再處理 CPT，最後進行細胞分層萃取，根據西方墨點法的結果可發現，處理過 ATM inhibitor 的細胞，PHRF1 在染色質萃取液的表現量比起沒有處理 ATM inhibitor 的 HeLa 細胞有下降的趨勢 (圖四 B)，證實了 ATM 確實有影響 PHRF1 移動到染色質的能力。

3.5 PHRF1 可以和 Nbs1 和 Ku70 交互作用

當我們證實了 PHRF1 在細胞受到基因毒性壓力後，會從細胞核質移動到染色質，而且 PHRF1 的移動跟 ATM 有關，同時我們另外實驗結果也發現 PHRF1 可以和組蛋白交互作用，因此何種機制可以聯結 PHRF1-組蛋白到 DNA 損害反應？有趣的是，我們從一篇發表在 2011 年 PNAS 的報導中發現甲基化組蛋白 H3K36me2 在細胞受到基因毒性壓力後會出現在 DNA 雙股斷裂處，而且 H3K36me2 會和 Ku70/Nbs1 形成免疫複合物，促進非同源末端黏合反應 (Non-homologous end joining, NHEJ) (Fnu *et al.*, 2011)。我們將 HA-tag PHRF1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-HA agarose 進行免疫沉澱，透過西方墨點法分析發現 PHRF1 可以跟 Nbs1 交互作用 (圖五 A)。另一方面，我們利用 Flag-tag Nbs1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-Flag agarose 進行免疫沉澱，再透過西方墨點法分析發現 Nbs1 和 PHRF1 出現在相同免疫沉澱物 (圖五 B)，確定了 PHRF1 可以

跟 Nbs1 交互作用。

接著我們想確認 PHRF1 能否跟 H3K36me2 以及 Ku70 交互作用，同樣的將 HA-tag PHRF1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-HA agarose 進行免疫沉澱，然後透過西方墨點法分析，結果證實了 PHRF1 可以跟 H3K36me2 以及 Ku70 進行作用（圖六）。

3.6 PHRF1 可以影響末端黏合的效率

為了研究 PHRF1 是否影響非同源末端黏合，我將可表現 Luciferase 的載體 pGL3-promoter 利用限制酵素(HindIII)切斷，正常情況下，斷掉的表現載體 pGL3 無法正常表現 Luciferase 重組蛋白，但是如果細胞進行非同源末端黏合反應，就有可能將斷掉的表現載體接合起來，並且可以正常表現 Luciferase，利用可以藉由冷光的吸收強度來判斷細胞內非同源末端接合反應的效率。我們建構了內生性 PHRF1 被抑制的穩定細胞株，並且利用西方墨點法確認這穩定株的 PHRF1 表現量有明顯下降（圖七 A），接著進行末端黏合檢驗，利用 sh-scramble 當作控制組（不會影響細胞內 PHRF1 的表現，其 Luciferase 的吸收量設定為 100%），將先前建構具有 pGL3-promoter-Luciferase 的質體，利用限制酵素切斷後，將這線形的質體分別轉染 sh-scramble、sh-PHRF1#1、sh-PHRF1#2 三種 HEK293T 細胞，24 小時後收取全蛋白萃取液，檢測細胞內 Luciferase 所發出的冷光。實驗結果發現 sh-PHRF1 HEK293T 細胞株的 Luciferase 吸收光強度比 sh-scramble HEK293T 少了約 30-40%（圖七 B）。

相對的，我們利用 Lenti-virus 建立大量表現 PHRF1 的穩定細胞株，西方墨點法確定 PHRF1 在穩定細胞株內大量表現後（圖八 A），進行了末端黏合試驗，結果發現大量表現 PHRF1 的穩定細胞株，其末端黏合的效率約五到六倍遠大於僅送入空質體 Lenti-6/V5 的控制組（圖八 B）。

第四章 總結與討論



總結實驗結果，PHRF1 主要分布於細胞核，若細胞遭受到基因毒性壓力，則會從細胞核質移動到染色質，PHRF1 的移動能力是受到 ATM 蛋白質磷酸激酶的影響，而且移動到染色質的目的很有可能是聯絡 H3K36me2 與 Nbs1，將細胞染色體 DNA 雙股斷裂的訊息傳遞下去，進一步促進細胞進行非同源末端接合反應，來修補染色體 DNA 的雙股斷裂 (圖九)。我們的研究發現了 H3K36me2 這個組蛋白密碼是可以透過 PHRF1 將訊息傳遞給 DNA 損害反應中的 Nbs1，並進一步促進非同源末端黏合，是非常重大的發現，但還是有許多地方要我們一步步釐清。

1. PHRF1 與組蛋白密碼的關聯

首先，我們已經確定 PHRF1 可以將 H3K36me2 這個組蛋白密碼的訊息傳遞給 Nbs1，並且引發非同源末端接合反應，但是我們實驗室也發現，PHRF1 可以跟 H3K36me3 以及 H4K20me3 進行交互作用，目前 H3K36me3 的功能與錯誤配對修復 (Mismatch repair) 相關(Li *et al.*, 2013)，而 H4K20me3 會影響基因表現(Stender *et al.*, 2012)，究竟 PHRF1 在這兩個組蛋白密碼中扮演著怎樣的角色，我們正在釐清。

2. PHRF1 與 H3K36me2 與 Nbs1 交互作用的形式

我們知道 PHRF1 可以在細胞內跟 H3K36me2 以及 Nbs1 形成免疫沉澱複合物，但是我們想更清楚確定，究竟 PHRF1 與 H3K36me2 和 Nbs1 是進行直接的蛋白-蛋白結合，還是間接的蛋白-蛋白交互作用。為了回答這問題，我們未來將著手進行試管內 (*in vitro*) 試驗，利用大腸桿菌表現的 PHRF1 重組蛋白，與人工合成的甲基化組蛋白多肽鏈進行試管內下拉 (pull down) 試驗，以及與大腸桿

菌表現的 Nbs1 重組蛋白進行試管內下拉試驗，進一步確認 PHRF1 與 H3K36me2 和 Nbs1 的交互作用模式。



3. ATM 對 PHRF1 磷酸化的確切位置

Matsuoka *et al.* 發現 ATM 可以對 PHRF1 的 S925 及 S1389 磷酸化，我們則確定了 ATM 可以影響 PHRF1 由細胞核質移動到染色質的能力。我們推論 PHRF1 很有可能是因為被 ATM 將 S925 或是 S1389 磷酸化後，產生移動能力，因此哪一個胺基酸是真正影響 PHRF1 移動的關鍵點？為了回答這個問題，我們未來將建構 PHRF1-A925 以及 PHRF1-A1389 的單點突變，來確認這個推論是否正確。

4. PHRF1 與 Nbs1 的交互作用是否影響非同源末端黏合

根據 Matsuoka *et al.* 的發現，PHRF1 第 910-913 胺基酸的位置為 SDTE motif，是被預測為可以跟 Nbs1 進行交互作用的區域(Wu, Luo, Lou, & Chen, 2008)，同時 PHRF1 本身的 S925 以及 S1389 也很可能與 Nbs1 的 FHA/BRCT domain 結合(Lloyd *et al.*, 2009)，我們想進一步調查 S925、S1389 以及 SDTE motif 是否會影響 NHEJ，為了回答這個問題，我們除了利用單點突變的質體，也將建構 PHRF1- Δ DTE 的 deletion mutant，來確認 PHRF1 與 Nbs1 的交互作用確實可以影響 NHEJ。

5. PHRF1 可以促進蛋白質泛素化

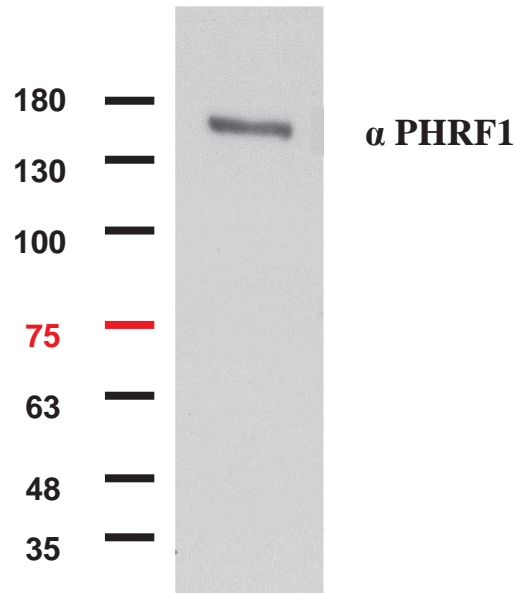
根據 PHRF1 的蛋白質序列，我們發現 PHRF1 還有一個重要的 Ring finger domain，我們著手建構了 HA-tag Ring，將這質體轉染 HEK293T 細胞 (HA-tag PHRF1, HA-tag N4, HA-tag N6 當作控制組)，並同時共轉染 Flag-tag ubiquitin，處理 MG132 (proteasome inhibitor)，進行 *in vivo* ubiquitination assay 分析，利用 anti-Flag agarose 進行免疫沉澱收取表現蛋白，然後透過西方墨點法，初步結果顯示 PHRF1 的 Ring finger 具有對受質泛素化的特性(附圖一)。這個實驗結果增

添了 PHRF1 的重要性，一個既可以辨識 H3K36me2 組蛋白密碼，並將此訊號聯絡到 DNA damage response，同時又可以將許多受質接上泛素，而且泛素化已經不再只是降解蛋白質這一途徑可走，同時也可能是改變受質生理功能的生物標記，因此未來我們也會在 PHRF1 進行泛素化的功能進行更多研究，揭露其重要性。

6. PHRF1 的 SCD domain 使其具備移動能力

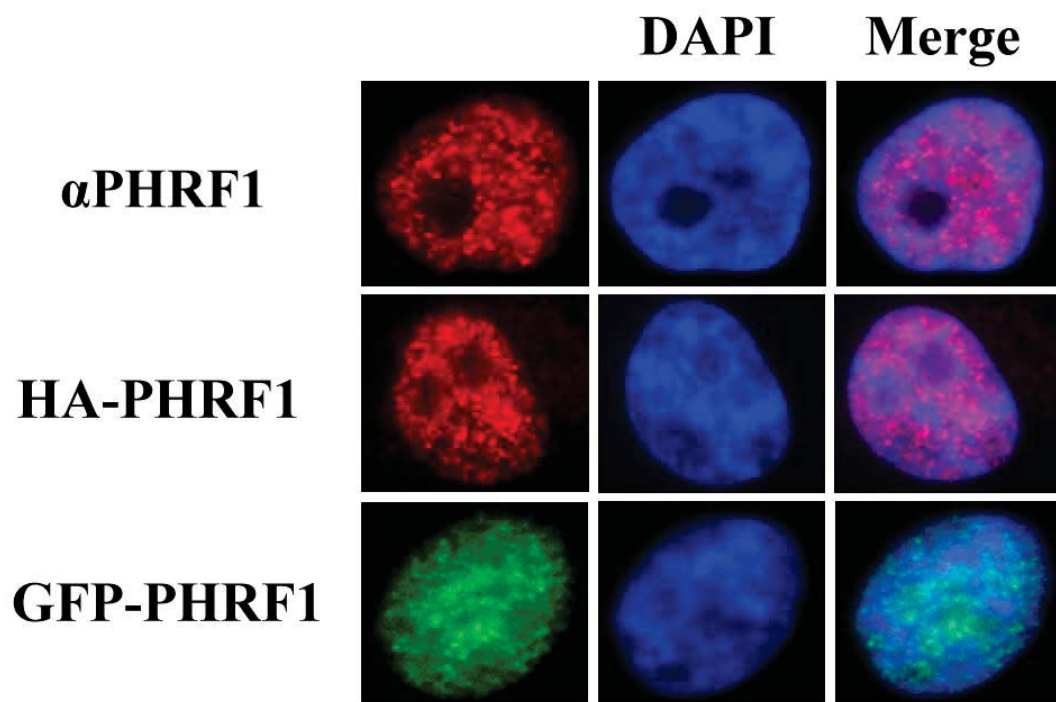
分析 PHRF1 胺基酸序列發現 PHRF1 具有 Ring finger domain (a.a. 107-152)，PHD domain (a.a. 185-233) 和 SCD domain (a.a. 925-1649)。為了了解 PHRF1 哪個功能區域遭受基因毒性壓力時負責由細胞核質移動到染色質，因此我們建構了 PHRF1 的 deletion mutants(附圖二): HA-tag N6 (缺失 Ring finger 和 PHD domain)，還有 HA-tag N10 (缺失 SCD domain)，將這兩個表現質體轉染 HEK293T 細胞後，再處理 CPT 造成 DNA 雙股斷裂，接著進行細胞分層萃取實驗，結果顯示缺乏 SCD domain 的 N10 片段無論是否處理 CPT，它在染色質萃取液中的出現量均無明顯差異；相對的，具備 SCD domain 的 N6 片段在沒有遭受基因毒性壓力情況下僅有小量分布在染色質萃取層，一旦細胞遭受基因毒性壓力，HA-N6 重組蛋白便可大量出現在染色質萃取液(附圖三)。這結果顯示 SCD domain 負責 PHRF1 在遭受基因毒性壓力後從細胞核質移動到染色質，而不具備 SCD domain 的 N10 則缺乏這樣的能力。

第五章 實驗結果圖表



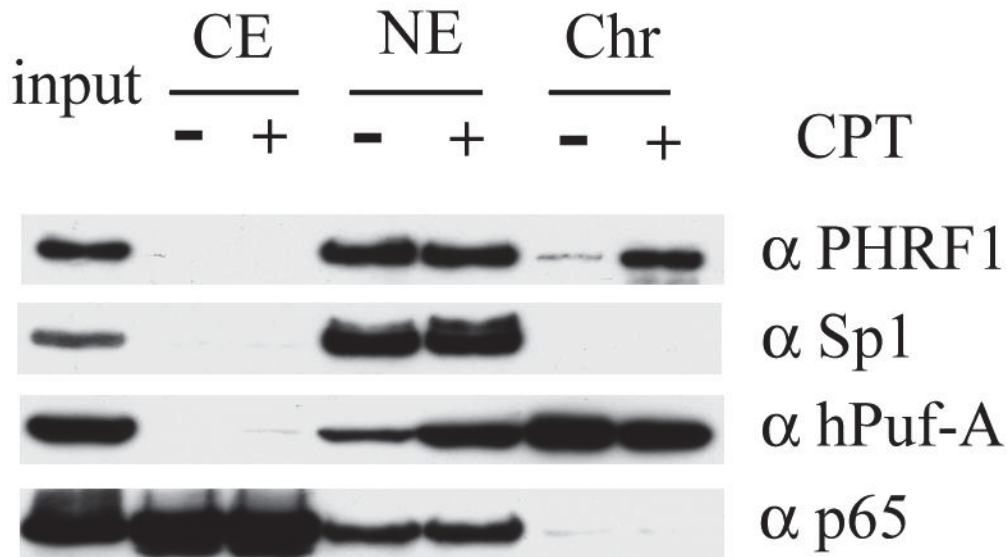
圖一. PHRF1 的分子量大小

將 HeLa 細胞以 PBS 清洗過後，加入細胞萃取液，利用小鼠抗 PHRF1 的單株抗體進行西方墨點法分析，偵測到 PHRF1 為一大約 160 kDa 的蛋白質。



圖二. PHRF1 主要分布於細胞核

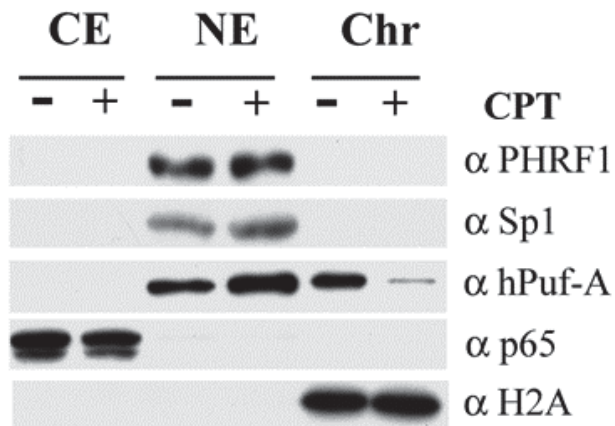
對 HeLa 細胞進行免疫螢光染色，發現內生性 PHRF1 主要分布在細胞核。
將插入 HA-tag PHRF1、GFP-tag PHRF1 的質體 DNA 轉染 HEK293T 細胞，實驗
結果都指出 PHRF1 是一個核蛋白。



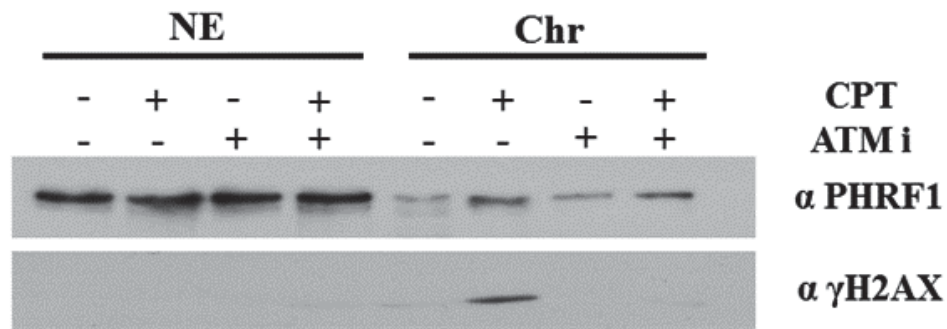
圖三. PHRF1 受到基因毒性壓力後會移動到染色質

利用細胞分層萃取，再透過西方墨點法分析，發現 PHRF1 主要分布於細胞核質萃取層 (NE)，少量分布在染色質萃取層 (Chr)。但利用 CPT 使細胞遭受基因毒性壓力 (DNA 雙股斷裂)時，PHRF1 會從細胞核質萃取層移動到染色質萃取層。h-PufA 為染色質的控制組，Sp1 為核質的控制組， p65 (NF- κ B) 為細胞質的控制組。

(A)



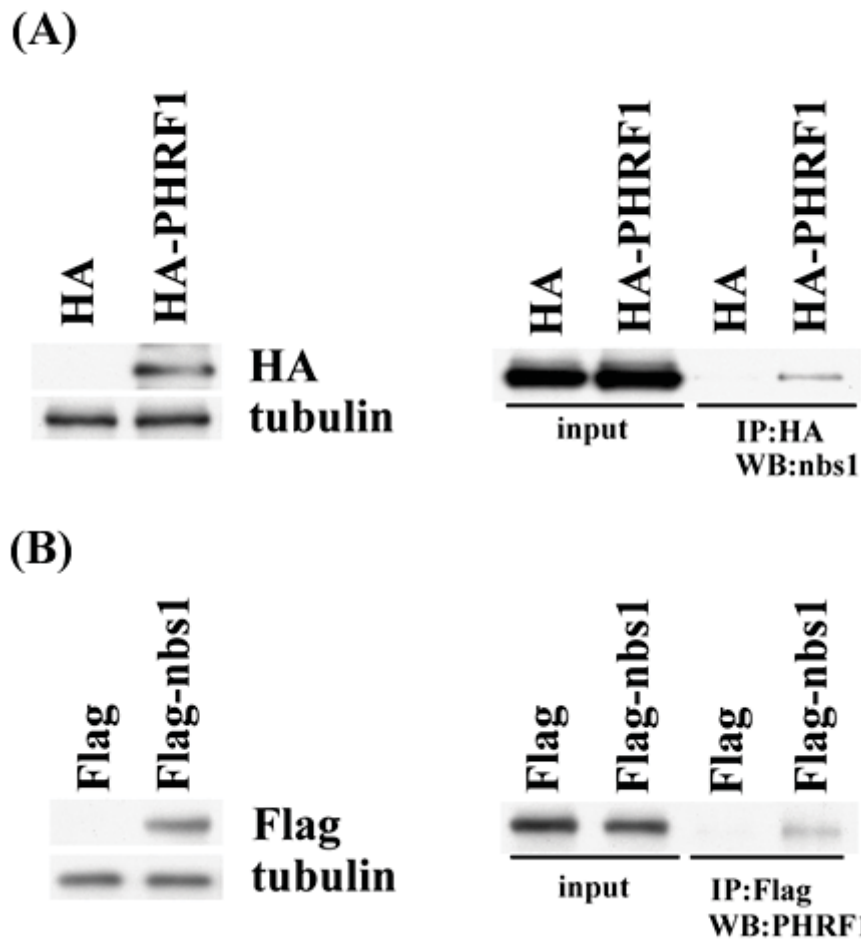
(B)



圖四. ATM 決定 PHRF1 移動至染色質

(A) 內生性缺失 ATM 表現的細胞株處理 CPT 後，進行細胞分層萃取實驗，結果顯示內生性缺乏 ATM 的細胞不管遭受 CPT 處理與否，染色質萃取層都無法發現 PHRF1。

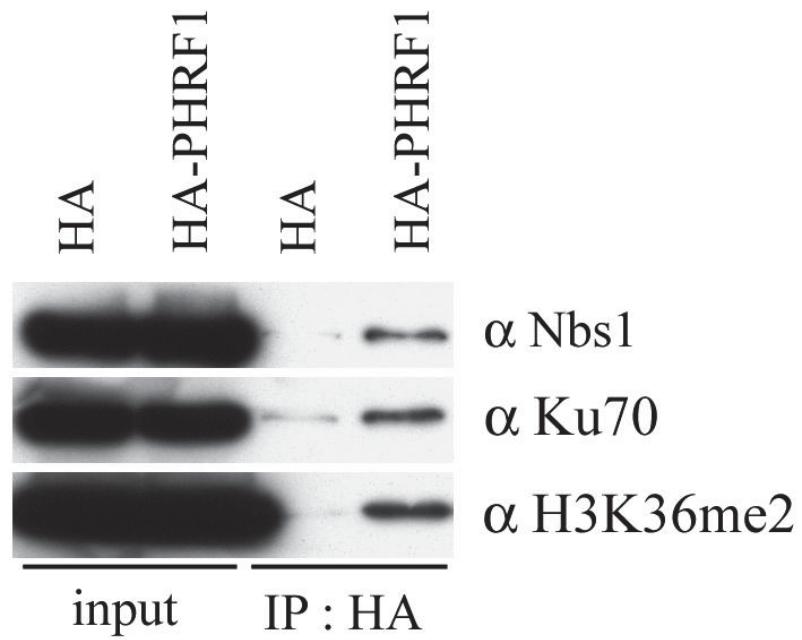
(B) 利用 ATM inhibitor (KU55933)處理 HeLa 細胞後處理 CPT，再進行細胞分層，西方墨點法的結果發現，處理過 ATM inhibitor 的細胞，PHRF1 在染色質萃取層的量比起沒有處理 ATM inhibitor 的細胞有減少的趨勢。



圖五. PHRF1 可以和 Nbs1 交互作用

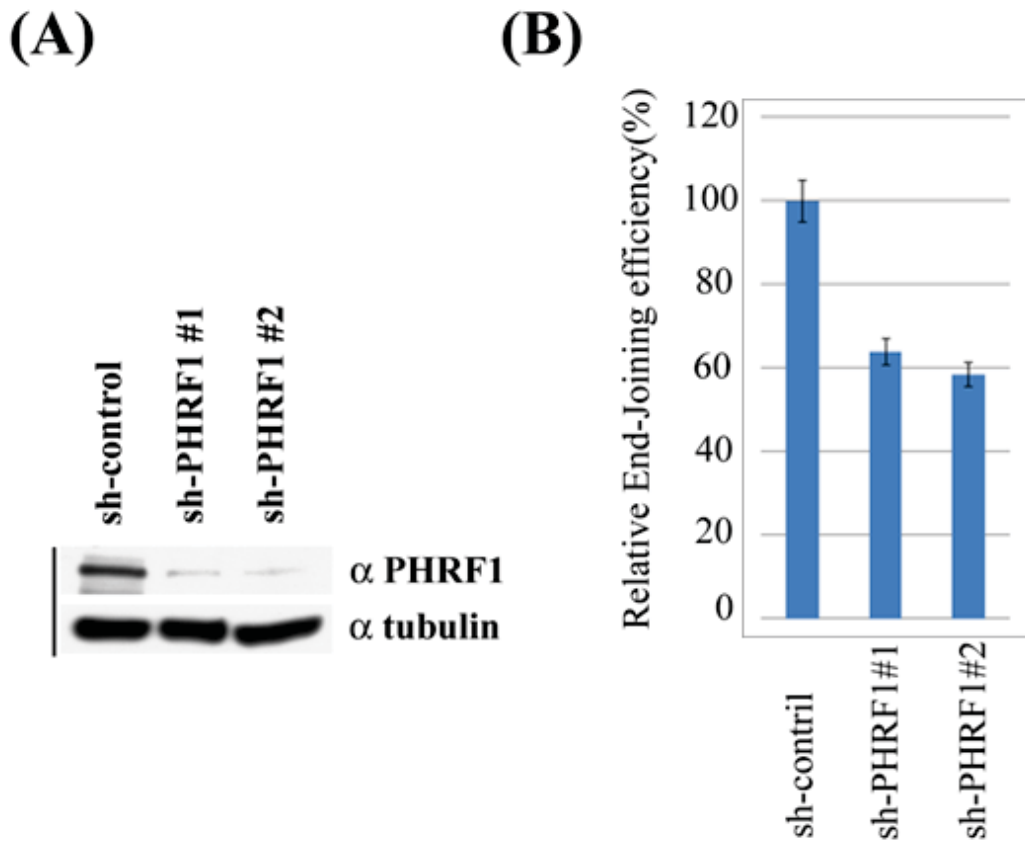
(A) 將 HA-PHRF1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-HA agarose beads 進行免疫沉澱，西方墨點法分析，發現 PHRF1 可跟 Nbs1 交互作用。

(B) 另一方面，利用 Flag-Nbs1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-Flag agarose beads 進行免疫沉澱，西方墨點法發現 Nbs1 可跟 PHRF1 交互作用。



圖六. PHRF1 可以和 H3K36me2 和 Ku70 交互作用

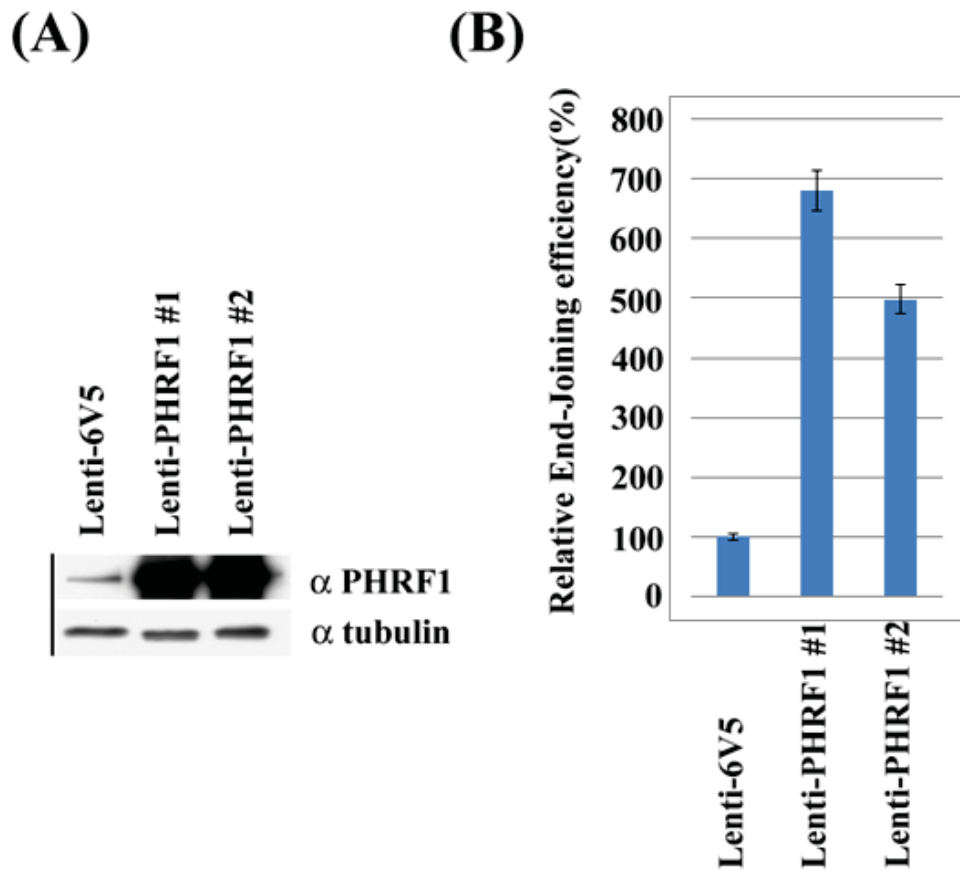
將 HA-PHRF1 轉染 HEK293T 細胞，利用 anti-HA agarose beads 進行免疫沉澱西方墨點法分析發現 PHRF1 和 H3K36me2 以及 Ku70 出現在相同免疫複合物。



圖七. 缺乏 PHRF1 表現可降低末端黏合的效率

(A) 內生性 PHRF1 被抑制的穩定細胞株，並且利用西方墨點法確認這穩定株的 PHRF1 表現量有明顯下降。

(B) 表現 Luciferase 載體 pGL3-promoter 利用限制酵素切斷，將這線形的質體分別轉染至 sh-scramble、sh-PHRF1#1、和 sh-PHRF1#2 HEK293T 細胞，24 小時後收取全蛋白萃取液，檢測細胞內 Luciferase 所發出的冷光比率。

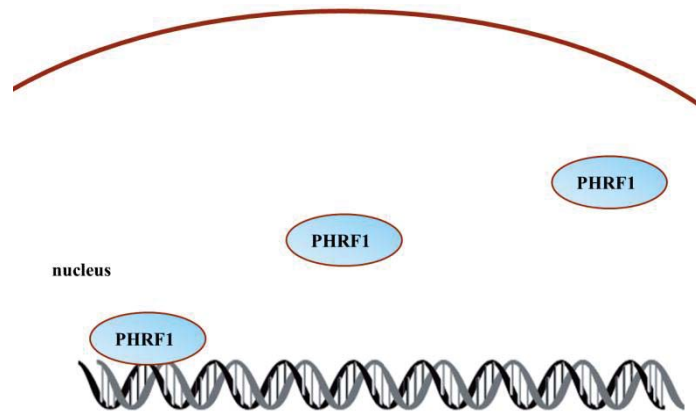


圖八. 大量表現 PHRF1 可增加末端黏合的效率

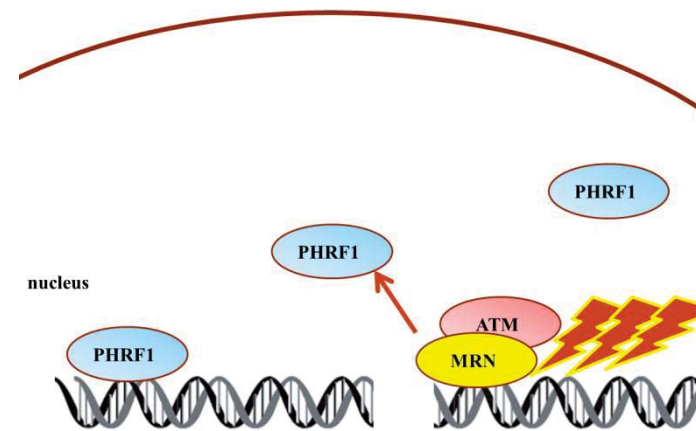
(A) 利用 Lenti-virus 建立大量表現 PHRF1 的穩定細胞株，西方墨點法確定 PHRF1 在穩定細胞株內大量表現。

(B) 表現 Luciferase 載體 pGL3 利用限制酵素切斷，將這線形的質體分別轉染至大量表現 PHRF1 的穩定細胞株，Lenti-6/V5 為僅送入空質體的控制組，24 小時後收取全蛋白萃取液，檢測細胞內 Luciferase 所發出的冷光比率。

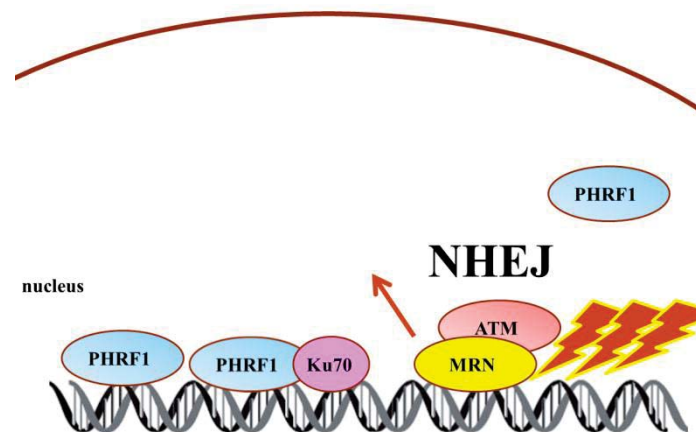
圖九. PHRF1 影響 NHEJ 途徑示意圖



正常情況下 PHRF1 主要存在於細胞核質，少部分位在染色質上。

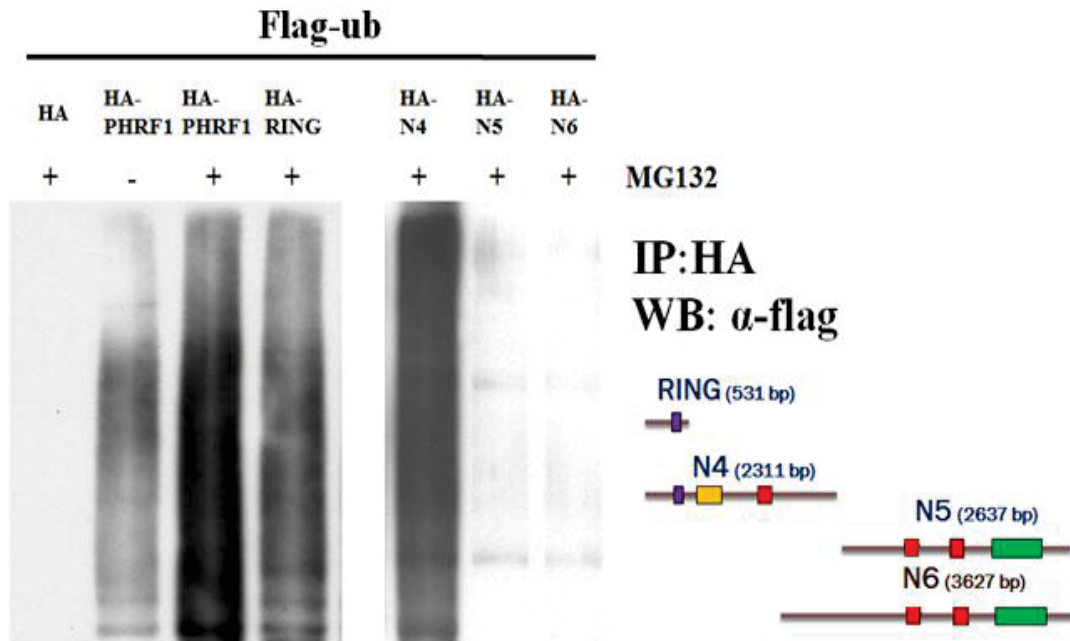


當細胞遭受基因毒性壓力時，DNA 產生雙股斷裂，此時 MRN complex 活化 ATM，ATM 進一步磷酸化 PHRF1。



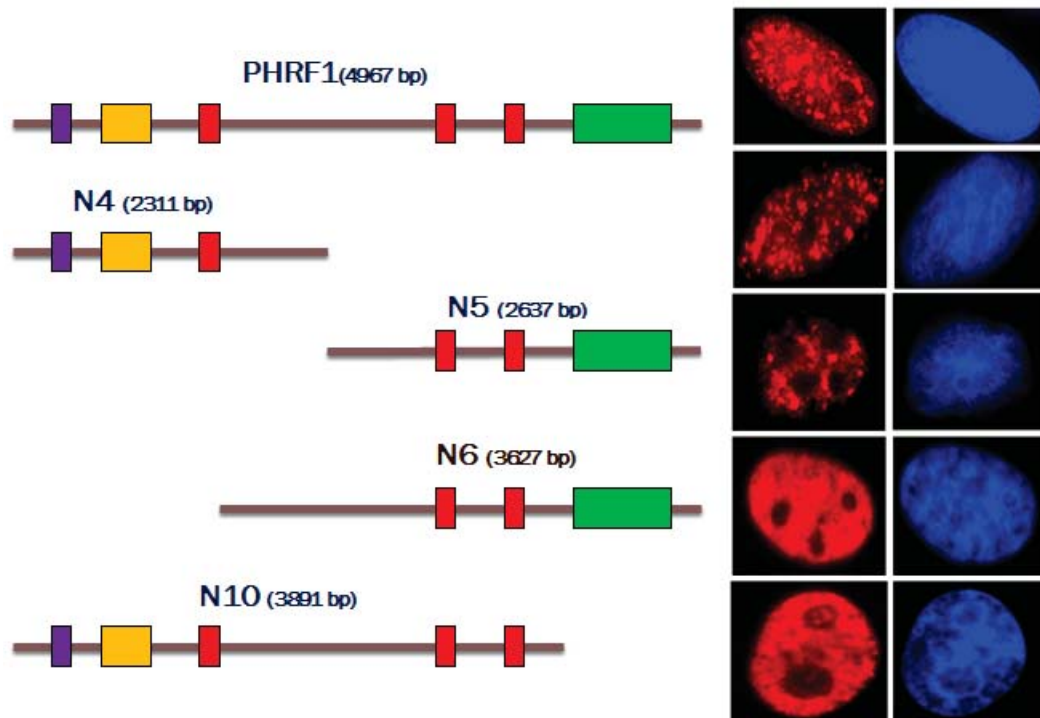
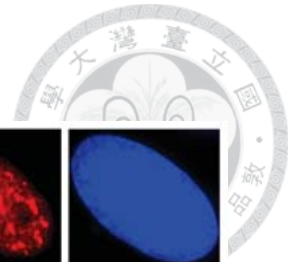
PHRF1 被磷酸化後移動到染色質，並且促進細胞進行 NHEJ，使得斷掉的 DNA 重新黏合。

附錄



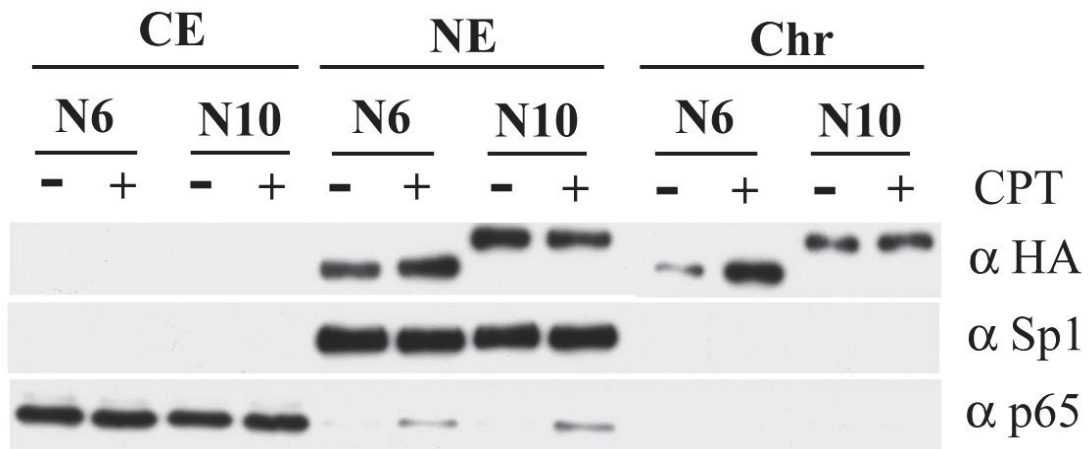
附圖一. PHRF1 可以促進多泛素化

我們建構了 HA-tag RING 這個質體 DNA，並將此質體轉染到 HEK293T 細胞，同時也分別進行 HA-tag PHRF1，HA-tag N4，HA-tag N5，HA-tag N6，48 小時後給予 MG132 處理 16 小時，利用 anti-Flag agarose 進行免疫沉澱收取表現蛋白，然後透過西方墨點法分析，確認 PHRF1 的 Ring finger 具有多泛素化的能力。其中，圖示紫色方塊是 ring domain，黃色方塊是 PHD domain，紅色方塊是 NLS domain，綠色方塊是 SCD domain。



附圖二. 2. PHRF1 deletion mutants 的建構

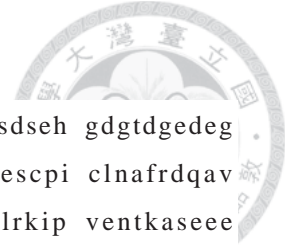
利用 HA-tag 的質體，分別接上了全長的 PHRF1 cDNA，以及只包含了 Ring finger 及 PHD domain 的 N4 片段，缺少 SCD 區域的 N10 片段，以及包含後半段 SCD domain 的 N5、N6 片段；分別將這些表現質體轉染 HeLa 細胞並藉由免疫螢光染色確定這些 PHRF1 截短蛋白都出現在細胞核內。



附圖三. SCD domain 增加 PHRF1 使其具備移動能力

我們想了解 PHRF1 上的哪個功能區域促使細胞遭受基因毒性壓力後，讓 PHRF1 產生移動到染色質的能力，因此我們建構了 PHRF1 的 deletion mutants HA-tag N6 (缺失 Ring finger 和 PHD domain)，還有 HA-tag N10 (缺失 SCD domain)，將這兩個質體轉染 HEK293T 細胞，然後利用 CPT 產生基因毒性壓力，接著對這些細胞進行細胞分層實驗，結果指出了具備了 SCD domain 的 N6 是有助於 PHRF1 在遭受到基因毒性壓力後，協助它從細胞核質萃取液，移動到染色質萃取液，而缺乏 SCD domain 的 N10，雖然在染色質萃取層有分布，但對 CPT 的處理是屬於不敏感的。

附錄 2. PHRF1/KIAA1542 蛋白質序列



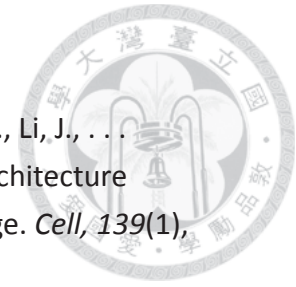
1 mdddsldeiv arspgpdghp qvgpadpagd feessvgssg dsgddsdseh gdgtdgedeg
61 aseeedledr sgsedseddg etllevagtq gkleaagsfn sddaescpi clnafrdqav
121 gtpencahyf cldcivewsk nanscpvdrf lfkiciraq fggkilkrip ventkaseee
181 edptfcevceg rsdredrlll cdgcdagyhm ecldpplqev pvdewfpec aapgvvllaad
241 agpvseeevs llladvvptt srlrpragrt raiartrqse rvratvnrnr istarrvqht
301 pgrlgsslld eaieavatgl stavyrqplt prtparrkrk trrrkkvpgr kktpsgpsak
361 skssatrskk rqhrvkkrrg kkvkseattr sriartlglr rpvhsscips vlkpvepslg
421 llradigaas lsifgdpyel dpfdsseels anlspisak rralsrsalq shqpvarpvs
481 vglrrrlpa avpepdlee pvpdllgsil sgqslmlgs sdviihrdgs lsakraapvs
541 fqrnsgslsr geegfkgclq pralpsgspa qgpsgnrpqs tglscqgrsr tpartagapv
601 rldlpaapga vqarnlsngs vpgfrqshsp wfngtnkhtl plasaaskis srdsckppers
661 vvpgpplkpa prrtdiselp ripkirrddg grrdaapah gqsieipsac isrltgregt
721 gqpgrgtrae seassrvpre pgvhtgssrp papsshgsla plgpsrgkgv gstfesfrin
781 ipgnmahssq lsspgfcentf rpvdckeqrk enpsplfsik ktkqlrsevy dpsdptgsds
841 sapgsspers gpgllpseit rtisinspka qtvqavrcvt sytvesifgt epepplgpss
901 amsklrgava aegasdtere eptesqglaa rlrpspsep wdeedgasc tffgseertv
961 tcvtvvepea pspdvqlqaa thrvvelrpp srsrstsssr srkkakrkrv srehrtrsg
1021 trsesdrss rsaspsvgee rrrqrskak srrssdrss sserakrka kdksherrg
1081 pwghsrtsr srgspgsss yehyesrkkk krrsarprg recsptsle rlrhkhqre
1141 rsherprke svawprdrk rrsrpsseh rarehrprs rekwpqrsh sperkgavre
1201 aspaplaqge pgedlprl palgeahvsp evatadkapl qappvlevaa ecepdldld
1261 ygdsveaghv fddfssdavf iqlddmsspp spestdsspe rdfplkpalp paslavaiiq
1321 revslmhded psqppplpeg tqephllrpd aaekaeapss pdvapagked spsasgrvqe
1381 aarpeevsq tpllrsalv krvtwnlqes essapaedra praplhrpqk pregawmed
1441 vaptgvrqvf selppshvl pepgfpdtdp sqvyspglpp apaqpssipp calvsqptvq
1501 filqgslplv gcgaaqlap vpaaltase pasqataasn seektpaprl aaektkkeey
1561 mkkhmqera veevklaiqp fyqkrevtke eykdilrkav qkichksge inpvkvanlv
1621 kayvdkyrhm rrhkkpeage epptqgaeg

參考文獻



- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., . . . Chen, Z. J. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, *103*(2), 351-361.
- Fnu, S., Williamson, E. A., De Haro, L. P., Brenneman, M., Wray, J., Shaheen, M., . . . Hromas, R. (2011). Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(2), 540-545. doi: 10.1073/pnas.1013571108
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1986). The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, *33*, 19-56, 301.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C. J., Green, S. J., Martin, N. M., Orr, A. I., . . . Smith, G. C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, *64*(24), 9152-9159. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2727
- Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J. E., & Costanzo, V. (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J*, *27*(14), 1953-1962. doi: 10.1038/emboj.2008.128
- Jeggo, P. A., & Lobrich, M. (2005). Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle*, *4*(3), 359-362.
- Kanaar, R., & Wyman, C. (2008). DNA repair by the MRN complex: break it to make it. *Cell*, *135*(1), 14-16. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.027
- Lee, J. H., & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, *308*(5721), 551-554. doi: 10.1126/science.1108297
- Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., & Li, G. M. (2013). The Histone Mark H3K36me3 Regulates Human DNA Mismatch Repair through Its Interaction with MutS α . *Cell*, *153*(3), 590-600. doi:

10.1016/j.cell.2013.03.025



- Lloyd, J., Chapman, J. R., Clapperton, J. A., Haire, L. F., Hartsuiker, E., Li, J., . . . Smerdon, S. J. (2009). A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. *Cell*, *139*(1), 100-111. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.043
- Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, *417*(3), 639-650. doi: 10.1042/BJ20080413
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., . . . Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, *316*(5828), 1160-1166. doi: 10.1126/science.1140321
- Meek, K., Dang, V., & Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol*, *99*, 33-58. doi: 10.1016/S0065-2776(08)00602-0
- Mellor, J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell*, *126*(1), 22-24. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.028
- Mendez, J., & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol*, *20*(22), 8602-8612.
- Roberts, S. A., Strande, N., Burkhalter, M. D., Strom, C., Havener, J. M., Hasty, P., & Ramsden, D. A. (2010). Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, *464*(7292), 1214-1217. doi: 10.1038/nature08926
- Stender, J. D., Pascual, G., Liu, W., Kaikkonen, M. U., Do, K., Spann, N. J., . . . Glass, C. K. (2012). Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell*, *48*(1), 28-38. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.020
- Williams, R. S., Williams, J. S., & Tainer, J. A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling,

and the chromatin template. *Biochem Cell Biol*, 85(4), 509-520. doi: 10.1139/O07-069

Wu, L., Luo, K., Lou, Z., & Chen, J. (2008). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32), 11200-11205. doi: 10.1073/pnas.0802885105

Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439. doi: 10.1038/35044005

