

分枝杆菌非同源末端连接生理功能及其在基因编辑中的应用

向莎莎, 黄煜, 谢建平*

西南大学 生命科学学院 现代生物医药研究所, 重庆 400715

向莎莎, 黄煜, 谢建平. 分枝杆菌非同源末端连接生理功能及其在基因编辑中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1280-1290.

XIANG Shasha, HUANG Yu, XIE Jianping. Non-homologous end-joining (NHEJ): physiological function in *Mycobacterium* and application in gene editing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1280-1290.

摘 要: DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)被认为是生物体内最为严重的一种 DNA 损伤形式, 它不仅会导致基因组失去稳定性, 还可能引发细胞死亡。同源重组(homologous recombination, HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)是 2 种主要的 DNA 双链断裂修复方法。参与 NHEJ 途径的核心成分在酵母和人中高度保守, 部分细菌如分枝杆菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌, 也具有 NHEJ 修复能力。NHEJ 可能在分枝杆菌潜伏期的双链修复中发挥重要作用。本文对分枝杆菌中 NHEJ 的修复机制及其关键组分进行了系统综述, 并探讨了其在基因编辑领域的应用前景, 深入阐述了分枝杆菌 NHEJ 途径及其最新研究进展, 为分枝杆菌 NHEJ 修复分子机制提供了新见解并为分枝杆菌 NHEJ 的应用提供了理论基础。

关键词: 分枝杆菌; 非同源末端连接; 双链断裂; 基因编辑

Non-homologous end-joining (NHEJ): physiological function in *Mycobacterium* and application in gene editing

XIANG Shasha, HUANG Yu, XIE Jianping*

Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: DNA double-strand breaks represent a common type of serious DNA damage in living organisms, causing instability of the genome and leading to cell death. Homologous recombination and non-homologous end-joining (NHEJ) are the two main ways to repair DNA

资助项目: 国家自然科学基金(82072246, 82472325)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82072246, 82472325).

*Corresponding author. E-mail: georgex@swu.edu.cn

Received: 2024-08-05; Accepted: 2024-11-26; Published online: 2024-11-27

double-strand breaks. The core components involved in the NHEJ pathway are highly conserved in both yeast and humans. A few bacteria such as *Mycobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus subtilis* also have the NHEJ mechanism. NHEJ plays a key role in the double strand repair of *Mycobacterium* in latency. This paper summarizes the mechanism and important components of NHEJ in *Mycobacterium*, introduces the application of NHEJ in gene editing, and reviews the research progress of the NHEJ pathway in *Mycobacterium*. We hope to bring new insights into the molecular mechanism and provide clues for the application of NHEJ in *Mycobacterium*.

Keywords: *Mycobacterium*; non-homologous end-joining; double-strand breaks; gene editing

DNA 携带着生物体生存和繁衍所需的遗传信息,因此维持 DNA 分子的完整性对细胞至关重要,但外部环境及体内因素往往会诱发 DNA 分子发生变化或损伤。DNA 损伤通常包括碱基的缺失、插入、替换以及 DNA 分子的断裂等,其中 DNA 双链断裂是 DNA 损伤最严重的形式,对细胞正常生命活动维持乃至生存都造成了严重威胁^[1]。

在细胞中,双链断裂可以通过几种主要的修复途径进行修复^[2]。一种是同源重组修复(homologous recombination, HR),HR 依赖于同源 DNA 模板;在 DNA 双链断裂的修复过程中,HR 需要同源染色体或同源 DNA 片段,其中 DNA 断裂末端会与同源模板进行配对,然后复制修复缺失的片段^[3]。在真核生物中,HR 通常发生在 S 和 G2 期间^[4-5]。另一种主要的修复方式是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),它不需要依赖同源序列,能直接连接 DNA 双链断裂的末端,因此可以在细胞周期的所有阶段发挥修复作用;NHEJ 虽然迅速高效,但可能会造成一些序列缺失或一些片段的插入,是一种不精准修复^[6]。除了以上 2 种双链损伤修复途径外,细胞内还存在单链退火修复(single-strand annealing, SSA),这是双链断裂两端存在同向的同源序列时的修复方式,也会引入一些突变^[7-8]。这些修复途径在细胞中起着重要作用,能够有效保护基因组免受损伤,并防

止细胞死亡的发生。

1 NHEJ 修复概述

同源重组修复指的是在非姐妹染色单体或者同一染色体上,具备同源序列的 DNA 分子之间及分子内部产生的重新组合进程^[9]。该过程依赖多种蛋白质的催化,原核生物中常见的有重组酶 A (recombinase A, RecA)以及 RecBCD、RecF、RecO、霍利迪连结体(Holliday-junction)分解酶 RuvAB 和 RuvC 等^[10]。本课题组 Long 等^[11]利用转座子突变筛选库发现耻垢分枝杆菌 *ruvAB* 插入失活后提高了氟喹诺酮莫西沙星的抑菌和杀菌活性,刺激活性氧的产生,使细菌更容易死亡;还发现抑制 RuvAB 的六肽可以作为莫西沙星增效剂。真核生物中重要 HR 蛋白则有辐射敏感 51 蛋白(radiation sensitive 51, Rad51)、减数分裂重组 11 蛋白(meiotic recombination 11 homolog 1, MRE11)-Rad50 等^[12]。

真核生物中,NHEJ 修复由形成 Ku 异源二聚体的 Ku70 和 Ku80 亚基组成,Ku 异二聚体识别双链 DNA 末端并促进下游 NHEJ 重要蛋白的招募,完成双链断裂修复;作为 NHEJ 的核心元件,DNA 末端结合蛋白 Ku 和连接酶复合物 ligase IV 以及 X 射线修复交叉互补蛋白 4 (X-ray repair cross-complementing protein 4, XRCC4)在高等和低等真核生物高度保守^[6]。原核生物以前一直被认为不存在 NHEJ 系统,只

能依赖同源重组系统修复 DNA 双链断裂。随着细菌基因组序列的积累, Aravind 等^[13]以及 Doherty 等^[14]发现原核生物中存在着类似真核 Ku 的同源蛋白以及依赖于 ATP 的 DNA 连接酶, 并且在基因组上这些 *ku* 基因和 DNA 连接酶编码基因位置通常接近或位于一个操纵子结构中^[15]。

NHEJ 修复机制与 HR 不同, 其修复不依赖于 DNA 的同源性。与大多数 DNA 修复过程一样, NHEJ 途径修复双链断裂(double-strand breaks, DSBs)需要 3 种酶发挥活性: 去除受损 DNA 的核酸酶、协助修复的聚合酶以及修复磷酸二酯骨架的连接酶^[16]。真核生物 NHEJ 过程由 Ku70/Ku80 异二聚体、DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)以及 XRCC4 和 ligase IV 等复合物完成^[17]。原核生物的 NHEJ 途径比真核生物的 NHEJ 途径简单得多, 仅由 Ku 和 DNA 连接酶组成, 无需其他因子即可完成末端连接反应; 如在分枝杆菌中, Ku 蛋白和连接酶 D (DNA ligase D, LigD)是 NHEJ 修复机制的主要组成部分^[18]。

少数诸如分枝杆菌、铜绿假单胞菌以及枯草芽孢杆菌等原核生物(细菌)具有 NHEJ 修复通路^[13]。原核生物如结核分枝杆菌 Ku 蛋白包含 1 个 N 端核心(CORE)域和 1 个由最小(MIN)和扩展(EXT)区域组成的 C 端结构域(图 1A)。不同细菌中核心域较保守, 保守蛋白多为中性氨基酸, C 端不保守(图 1C)^[19]。LigD 是一种高分子量的多功能酶, 具有聚合酶、核酸酶和连接酶这 3 种催化活性以及对应的结构域, 包括 ATP 依赖性连接酶结构域(ligase domain, LIG)、聚合酶结构域(polymerase domain, POL)和磷酸酶结构域(phosphatase domain, PE), 在不同的细菌中, 这 3 种成分的排列顺序不同^[16](图 1B)。

2 分枝杆菌 NHEJ 系统的组成与修复机制

Ku 可能最初以同源二聚体的形式存在, 这一特性与其在噬菌体中的功能机制相似, 即保护线性 DNA 末端不受核酸酶的降解。随着生物体的进化, 形成了包含 2 种组分的 NHEJ 复合体; 同时伴着基因组的倍增, 产生了 Ku 蛋白异源二聚体并获得额外的结构域, 如 vWA 和 SAP, 促进其他蛋白质募集到 DNA 损伤位点并与 DNA 结合^[13], 形成了真核生物中功能多样化的 Ku70/Ku80 异源二聚体^[20-21]。本课题组 Zhao 等^[22]利用转座子突变库筛选发现结核分枝杆菌 Rv1836c 的同源分子 MSMEG_3641 含有 1 个在分枝杆菌中高度保守的 vWA 结构域, 其突变可改变分枝杆菌菌落形态, 破坏生物膜并减弱迁移能力。

与真核生物中由 Ku70/Ku80 异源二聚体组成不同, 细菌中仅包含由单一 *ku* 基因编码的 Ku 蛋白同源二聚体; 细菌 Ku 蛋白比真核细胞的 Ku70/Ku80 异二聚体小得多, 只有大约 30–40 kDa, Ku 蛋白通过在断裂末端形成环状同源二聚体结构来保护受损的 DNA^[23]。Ku 核心区参与 Ku 蛋白的二聚化以及 Ku 与 DNA 的结合, Ku 扩展的 C 端通过与 LigD POL 结构域相互作用招募 LigD^[19]。Ku 蛋白的 C 末端也可以直接结合在没有游离末端的 DNA 上, 这种与内部 DNA 位点的结合特性可能有助于其募集到 DNA 损伤位点, 从而参与损伤修复过程^[24]。此外, C 端结构域的扩展限制了 Ku 与 DNA 结合能力, 而 Ku 核心结构域和最小 C 端结构域则有助于促进双链 DNA 的连接; 结核分枝杆菌 C 末端 D247、D250、S258 和 R262 的突变限制了 DNA 与 Ku 的结合; Ku 核心结构域还可以与 LigD 的连接酶结构域结合, 结核分枝杆菌中 Ku 蛋

白的 D250A 和 S258A 突变降低了 Ku 对 LigD 的亲和力, L251A 和 R262A 增加了 Ku 对 LigD 的亲和力^[19,25]。在细菌 NHEJ 途径中, Ku 蛋白能够识别并稳定 DNA 双链断裂的末端, 同

时保护新产生的末端免受核酸酶的降解; 当 Ku 与断裂的双链结合时, 能够保护其免受核酸酶的影响, 并招募 DNA 连接酶来修复 DSBs^[26]。

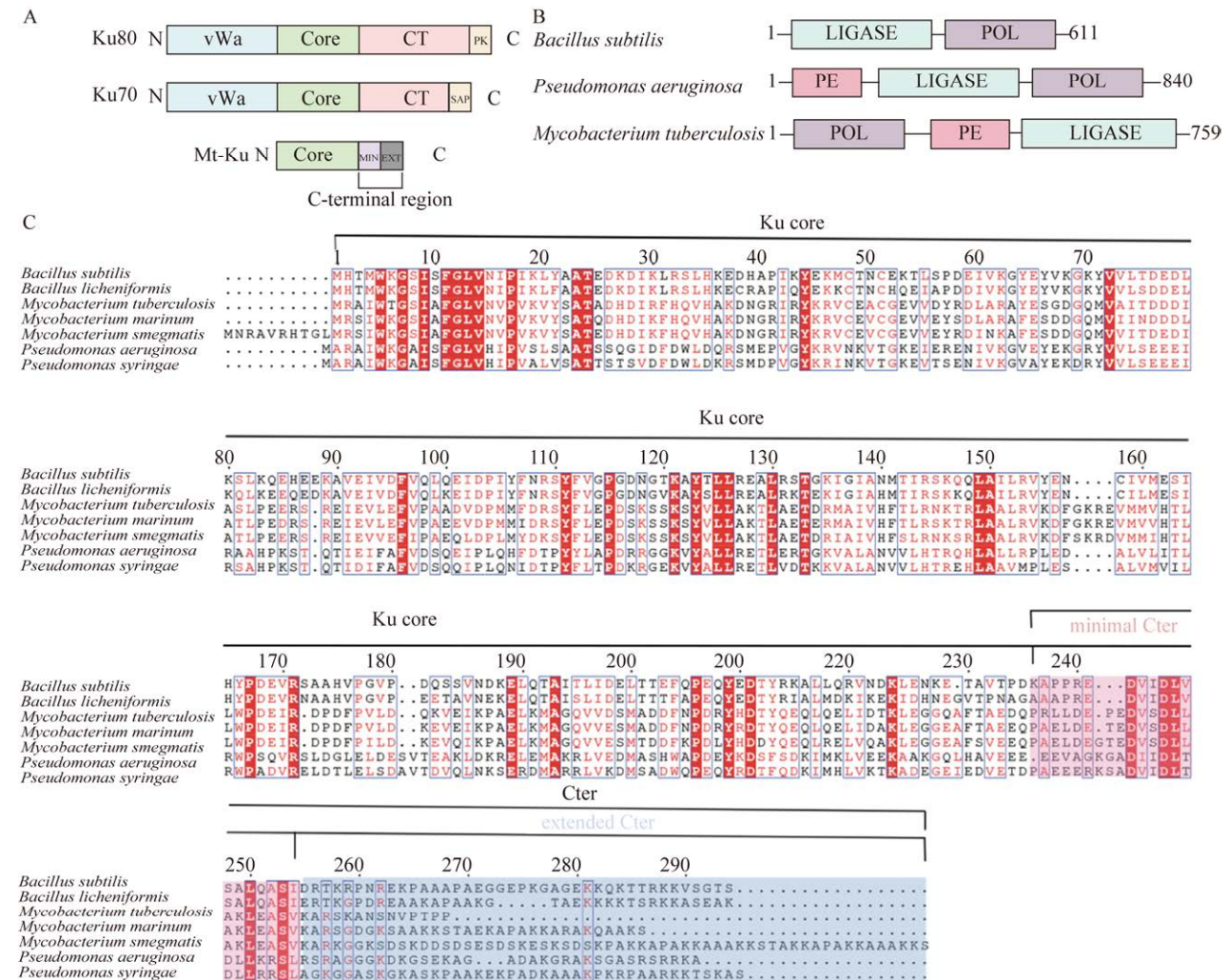


图 1 Ku 和 LigD 蛋白结构域 A: 真核生物 Ku70/Ku80 和结核分枝杆菌 Ku 蛋白结构域组成。B: 不同细菌 LigD 蛋白结构域组成。C: 不同细菌中 Ku 蛋白氨基酸序列比对。保守的氨基酸用红色表示; 保守的 Ku 最小 Cter 结构域和扩展 Cter 分别以粉色和蓝色突出显示。

Figure 1 Structural domains of Ku and LigD proteins. A: Structural domain composition of eukaryotic Ku70/Ku80 and *Mycobacterium tuberculosis* Ku proteins. B: Structural domain composition of different bacterial LigD proteins. C: Amino acid sequence comparison of Ku proteins in different bacteria. *Bacillus subtilis*: BDG79657.1; *Bacillus licheniformis*: GIN28443.1; *Mycobacterium tuberculosis*: QJF20997.1; *Mycobacterium marinum*: GJO48814.1; *Mycobacterium smegmatis*: ABK73702.1; *Pseudomonas aeruginosa*: GLE67244.1; *Pseudomonas syringae*: WP_044321276.1. Conserved amino acids are indicated in red, and the conserved Ku minimal Cter structural domain and extended Cter are highlighted in pink and blue.

根据形成连接酶-腺嘌呤核苷酸加合物所需的底物, DNA 连接酶可分为 NAD 依赖型(LigA)和 ATP 依赖型这 2 类; 在一些细菌如结核分枝杆菌中, 已发现 LigB、LigC 和 LigD 等 ATP 依赖性连接酶; 其中 LigB 最早在结核分枝杆菌中发现, 具有 DNA 结合结构域和核心连接酶结构域^[15-16]。而 LigC 则存在于分枝杆菌和农杆菌中, 只有 1 个核心连接酶活性区域, 缺乏其他的辅助区域^[27]。在分枝杆菌中, 当 *ligD* 基因缺失时, LigC 在 NHEJ 修复途径中发挥作用^[27]。LigD 中 LigD-POL 可以将脱氧核苷三磷酸或核糖核苷三磷酸添加到 DNA 底物中; 耻垢分枝杆菌中, 聚合酶(D136A/D138A)的丙氨酸取代突变在体外消除了聚合酶的活性, 同时会导致 NHEJ 保真度提高, 而总体效率几乎没有变化^[28]。LigD-PE 结构域是一种 3'-末端加工酶, 它可以切除引物模板上的一段核糖核苷酸, 留下单个核糖核苷酸; PE 还表现出磷酸二酯酶和单酯酶活性, 可将 3'-磷酸末端的 DNA 末端加工成 3'-OH^[29]。切除 LigD-PE 结构域对质粒 NHEJ 的效率或保真度没有太大的影响^[30]。LigD-LIG 是一种 ATP 依赖性 DNA 连接酶, 在体外具有相对较差的缺口连接活性, 单个核糖核苷酸会激活 LigD 连接酶活性^[31]。Aniukwu 等^[30]发现分枝杆菌体内 LigD 连接酶活性的减弱(无论是通过 K484A 活性位点突变还是通过 LIG 结构域的缺失)并没有显著降低质粒 NHEJ, 而 Δ *ligD* 菌株的 NHEJ 则出现了严重的下降, 说明可能存在功能冗余的 ATP 依赖性 DNA 连接酶。

在公共数据库中可获得基因组的原核生物中, 约有 25% 存在潜在的 NHEJ 修复系统^[27]。在这些预测具有 NHEJ 修复系统的细菌物种中, 有些细菌编码了几种 Ku 同源物, 主要是链霉菌家族的放线菌和 α 分支的变形菌; 例如, 70%

以上的链霉菌物种编码 1 个以上的 *ku* 基因, 一半以上的 α -变形菌拥有 2 个或 2 个以上的 *ku* 基因; 一些 *ku* 基因位于质粒上, 表明它们可能是通过水平基因转移获得的^[32]。已知的 NHEJ 连接酶也经常以多拷贝形式存在; 例如, 耻垢分枝杆菌编码 4 种 ATP 依赖的 DNA 连接酶(LigB、LigC1、LigC2 和 LigD)^[33]; 其中, LigD 是主要的 NHEJ 连接酶。而 LigC1 能够在耻垢分枝杆菌的替代 NHEJ (alt-NHEJ) 通路中与 Ku 蛋白协同作用, 这种依赖于 LigC1 的替代 NHEJ 修复途径需要 LigD 的聚合酶结构域(PolDom)参与, 结核分枝杆菌中的 LigC 同样能够支持这种替代 NHEJ 通路的运行^[34]。此外, 研究人员还在耻垢分枝杆菌中发现了一种替代末端连接(alternative end-joining, A-EJ), 这是一种在 NHEJ 关键蛋白失活条件下依赖连接酶 LigA 的修复方式^[18]。

体外实验显示只需要 Ku 和 LigD 就能够完成双链损伤的末端连接反应^[35]。体内实验也验证了这一点, 将分枝杆菌 Ku 和 LigD 异源转入大肠杆菌或者是缺失这 2 个同源蛋白的酵母细胞中, 结果显示能够将线性质粒 DNA 环化; 且 Ku 或 LigD 的缺失使质粒 DNA 平端或黏端 NHEJ 的修复效率明显下降^[30,36]。

真核生物 NHEJ 修复过程复杂, 首先受损的双链 DNA 会迅速与 Ku 异源二聚体(Ku70 和 Ku80)结合, 后者是一种环状结构, 能识别并结合到 DSB 末端^[37]。Ku-DNA 复合物招募下游 DNA-PKcs 分子形成复合物, 并激活其激酶活性, 使其磷酸化启动 NHEJ 途径^[38]。根据 DSB 产生的不同类型的 DNA 末端, 如平端、5'突出端、3'突出端和受损碱基, 募集各种 NHEJ 蛋白^[39]。如果断开的末端产生可以直接连接的突出端时, 由 XRCC4, ligase IV 和 XRCC4 样因子(XRCC4-like factor, XLF)所形成的复合物将

完成最后的连接反应^[40-41]。对于不能直接连接的 DNA 末端,就需要核酸酶 Artemis 以及 DNA 聚合酶 TdT、pol μ 或 pol λ 处理后,然后再进入最后的连接步骤^[42-43],在人体中,NHEJ 关键蛋白缺失已被证实通过多种机制与多种疾病的发生密切相关,如神经系统发病机制、癌症、免疫紊乱等^[44]。

原核生物中存在与真核生物 NHEJ 相关的关键因子,它们与 Ku70/Ku80 异二聚体和 DNA 连接酶 IV 具有功能同源性^[34]。原核生物 NHEJ 修复过程与真核生物类似,也可分为识别、联会、末端处理和连接这几个步骤。首先,Ku 蛋白识别并结合到 DSBs 位置,随后招募 LigD,LigD 的聚合酶结构域与 Ku 直接接触;后者特异性地识别 5'磷酸基团,并直接调节形成末端连接所必需的突触复合体;接着经过 LigD 的核酸酶区域的切割处理成可连接的片段,然后利用其聚合酶区域补齐缺口,最后通过连接酶区域连接完成修复^[45-46](图 2)。

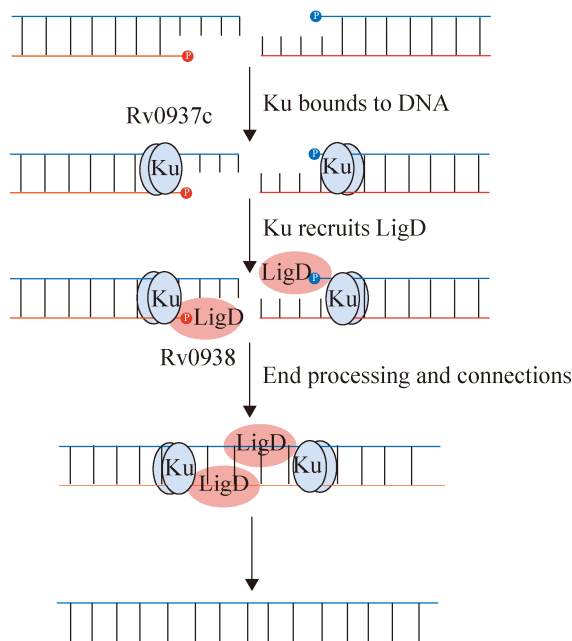


图 2 结核分枝杆菌 NHEJ 修复过程

Figure 2 NHEJ repair process of *Mycobacterium tuberculosis*.

3 分枝杆菌 NHEJ 系统的调控与生理功能

分枝杆菌属包含结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)等重要病原菌,以及约 200 种环境分枝杆菌。在感染过程中,结核分枝杆菌会暴露于一系列的环境损伤中,其中包括宿主的免疫反应,同时也可能会暴露于多种类型的 DNA 损伤剂中^[47]。像所有细胞生物一样,分枝杆菌也具有有效的 DNA 修复系统,这些系统在分枝杆菌发病机制中起着关键作用。NHEJ 在细胞周期的各个阶段均可修复断裂 DNA,可能在分枝杆菌潜伏期的双链断裂修复中发挥重要作用,并可能与病原菌在宿主中的生存以及耐药的产生有关。

虽然研究表明只需要 Ku 和 LigD 就能够完成 NHEJ 过程,但分枝杆菌中还存在其他影响 NHEJ 修复效率的蛋白^[30]。它们通过与 Ku 或 LigD 的相互作用,或通过自身功能的失活,调控 NHEJ 对 DSB 的修复能力;Sinha 等^[48]通过酵母双杂交试验证明分枝杆菌解旋酶 UvrD1 与 Ku 相互作用,并与 Ku 和 dsDNA 形成三元复合体;UvrD1 的解旋酶活性在 Ku_{Msm} 的存在下被刺激,而 *uvrD1* 的缺失使耻垢分枝杆菌对紫外线和电离辐射的杀伤以及 I-SceI 内切酶产生的 DNA 断裂敏感,证明了 UvrD1 在 NHEJ 修复 DSBs 中的作用。Chadda 等^[49]发现 Ku 能特异性地激活 UvrD1 单体的多轮解链,以及 UvrD1 C 末端 Tudor 结构域是 Ku-UvrD1 蛋白复合物的形成和激活所需的;还发现结核分枝杆菌中当 DNA 受体与 2 个或 3 个 Ku 二聚体结合时,UvrD1 被激活,这些结果都说明了 UvrD1 通过不同的激活机制在多种 DNA 修复途径中发挥作用。

Li 等^[50]通过串联亲和纯化方法(tandem

affinity purification, TAP)在耻垢分枝杆菌中筛选出了一种真核 NAD 依赖性脱乙酰酶(silent information regulator 2, Sir2)的同源物,这种脱乙酰酶与 Ku 和 LigD 相互作用,其缺失降低了体内 NHEJ 的效率,且缺失菌株对电离辐射的敏感性比野生型高约 10 倍。Zhou 等^[51]进一步研究还发现,随着菌株的生长,Ku 的乙酰化增加,相反 NHEJ 活性降低;耻垢分枝杆菌 Ku 中 K29 是一个重要的乙酰化位点,在细菌中是保守的,Sir2 的缺乏或 K29 的突变会影响 Ku 的数量及其乙酰化动力学,说明 Sir2 乙酰化可以调节 NHEJ 的活性。此外,研究还发现,分枝杆菌中 NHEJ 对电离辐射(ionizing radiation, IR)诱导产生的 DSBs 的修复作用在对数生长期受到负调控,这种抑制的机制似乎不依赖于 RecA,因为耻垢分枝杆菌中 *recA* 的缺失不会增加 NHEJ^[52]。

细胞中存在多种修复方式,NHEJ 与它们之间存在联系。静止细胞中的 DSB 修复基本上依赖于 NHEJ,但在一些处于复制阶段的 NHEJ 细菌中,NHEJ 和 HR 修复机制可能同时存在,它们之间也可能存在竞争关系^[53]。在真核生物中,Ku 蛋白能迅速隔离 DSB 游离端,并保护它们免受计划外核酸外切酶的影响,从而阻止 HR 继续进行;Ku 的清除涉及多种途径,包括泛素化、去甲基化、磷酸化和依赖 MRE11 的复合物 MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) (酵母)的核酸酶活性,该复合物在 NHEJ/HR 平衡中起着关键作用^[54]。在分枝杆菌中的体外分析显示,结核分枝杆菌 Ku 可防止 DSB 被 AdnAB 解旋酶-核酸酶切除,体内 HR 升高可补偿结核分枝杆菌 Ku 的失活;然而,分枝杆菌中 HR 的损失不能通过增加 NHEJ 来补偿^[52,55]。Yan 等^[56]发现通过增强海洋分枝杆菌 NHEJ 系统的高表达,抑制依赖 RecA 的同源重组修复途径并优化在

稳定期生成 DSBs 的过程,可以显著提高 NHEJ 修复效率。这些优化措施利用 CRISPR-Cas9^{stl1} 技术实现了高效的基因组编辑。

Ku 和 LigD 蛋白可能有助于将 NHEJ 与其他 DNA 修复途径偶联,如碱基切除修复(basic excision repair, BER);有报道称铜绿假单胞菌的 NHEJ 可以与其错配修复通路的组成部分 MutL (*Salmonella* LT7 mutator)蛋白联系,促进染色体缺失,防止噬菌体捕食^[57]。此外,Plóciński 等^[58]发现 LigC 在耻垢分枝杆菌稳定期参与碱基切除修复,表明 NHEJ 和 BER 之间的联系存在于 NHEJ 替代途径中。

CRISPR-Cas 系统也能产生双链断裂,它和 NHEJ 能产生拮抗作用;Csn2 是一种结合双链 DNA 末端的多聚体环状结合蛋白,具有与 Ku 蛋白相似的性质^[59]。Arslan 等^[60]发现 Csn2 在 DNA 末端的结合可以阻断 Ku 的进入并抑制 NHEJ 的有效修复。

4 分枝杆菌 NHEJ 在基因编辑中的应用

人类肺结核感染通常经历一个结核分枝杆菌活跃的复制期,随后进入长期的潜伏期。在潜伏期,结核分枝杆菌不进行复制,而是潜藏在多细胞炎症组织中,这个时期巨噬细胞和免疫细胞产生的氧化氮和过氧化氢等抗菌分子可能会导致 DNA 断裂;由于潜伏期细菌的 DNA 复制活动停止,NHEJ 修复途径成为结核分枝杆菌修复双链断裂的主要机制^[61],说明 NHEJ 途径可能在人类肺结核分枝杆菌感染中扮演重要的角色。Pitcher 等^[62]在 2 种相关的分枝杆菌噬菌体 Corndog 和 Omega 中发现了 Ku 同源物;这些蛋白质形成同源二聚体,以与其他 Ku 相同的方式结合 DNA 末端,并刺激宿主 NHEJ DNA 连接酶(LigD)连接末端,促进分枝杆菌噬

菌体基因组环化。

CRISPR-Cas 和 CRISPR 相关蛋白是一种细菌和古菌的适应性免疫系统,主要用于抵抗病毒等外源遗传物质的侵袭。结核分枝杆菌基因组有 2 个连续的长 CRISPRs 和 9 个 Cas 蛋白编码基因,包括 *cas2* 等^[63]。本课题组 Huang 等^[64]在缺乏 CRISPR-Cas 系统的耻垢分枝杆菌中过表达 *Rv2816c* 编码的 Cas2,发现 Cas2 介导的耻垢分枝杆菌应激反应变化与参与分枝杆菌应激反应和毒力的 σ 因子表达的改变有关,且 Cas2 降低了巨噬细胞内耻垢分枝杆菌的存活率。CRISPR-Cas 基因组编辑技术已经在原核和真核生物中得到广泛应用。随着科技的进步,这些基因组编辑技术也在结核分枝杆菌中得到一系列开发和应用,包括 CRISPR 辅助的同源重组基因组编辑、CRISPR 辅助的非同源末端连接基因敲除、单碱基编辑技术以及 CRISPRi 等多种方法^[65]。

CRISPR/Cas9 技术能够与 HR 共同应用于基因组编辑。利用外源片段发生同源重组的细菌因 Cas9 不能继续切割靶基因而得以存活,未发生同源重组的细菌则被持续切割而死从而完成基因编辑^[66-67]。然而,使用这种方法进行编辑时,DNA 编辑模板构建过程较复杂,且在大规模基因组编辑中也存在限制,而引入 NHEJ 相关蛋白则可以实现更加简便和高效的基因组编辑^[56]。NHEJ 结合 CRISPR 系统可以在许多种细菌中达到基因敲除的目的,包括一些没有 NHEJ 途径的细菌,且很多细菌使用的是分枝杆菌的 NHEJ 系统^[68]。在缺乏 NHEJ 机制的原核生物中,Cas9 诱导的 DNA 切割导致细胞死亡,这可以通过引入外源性 NHEJ 途径来挽救;如将结核分枝杆菌的 *ku* 和 *ligD* 基因整合到大肠杆菌中,并灭活 RecB 核酸外切酶,以确保 NHEJ 通路得以实现^[69]。来自耻垢分枝杆菌的

FnCas12a 辅助 NHEJ 系统也可以有效地诱导其他细菌随机大小的基因组缺失,该系统也可用于基因组大规模删除,但效率较低^[70]。因此,通过引入 DNA 结合蛋白 Ku 和连接酶 LigD 来修复细菌的 NHEJ 途径,可以显著提高 CRISPR 系统的编辑效率。CRISPR-NHEJ 介导的基因组编辑技术有助于构建分枝杆菌突变体,为分枝杆菌相关基因生物学功能的研究提供便利条件。

5 结语及展望

非同源末端连接是细胞 DNA 双链断裂的主要修复途径之一。研究人员已经对细菌 NHEJ 途径的机制及独特性质有了一定的了解。细菌 NHEJ 修复途径对于维持基因组稳定性和适应环境非常重要。相较于同源重组修复,NHEJ 不依赖于同源模板,使得细菌能够在条件恶劣或资源匮乏的环境中快速有效地修复双链断裂,对结核分枝杆菌等致病菌潜伏期时的双链断裂修复可能发挥重大作用。分枝杆菌中,除了 NHEJ 核心蛋白 Ku 和 LigD 外,分枝杆菌解旋酶 UvrD1 和脱乙酰酶 Sir2 也可能参与 NHEJ 过程,说明还可能参与 NHEJ 的其他蛋白。此外,NHEJ 和 HR 在修复双链损伤方面存在一种动态平衡,并且 Ku 和 LigD 蛋白可能有助于将 NHEJ 与碱基切除修复等其他 DNA 修复途径偶联。分枝杆菌 NHEJ 结合 CRISPR 系统可以在许多种细菌中达到基因敲除的目的,包括一些没有 NHEJ 途径的细菌,如大肠杆菌等。CRISPR-NHEJ 介导的基因组编辑技术简化了分枝杆菌等细菌突变体的构建过程。

尽管对于 NHEJ 的理解仍在不断深化,但关于分枝杆菌以及其他细菌 NHEJ 还有很多机制尚未明晰,如是否存在参与或调控 NHEJ 的其他蛋白? NHEJ 和 HR 在修复双链损伤方面的关系? NHEJ 与其他修复方式的联系?

CRISPR-NHEJ 如何在结核分枝杆菌等更多细菌中应用? 研究分枝杆菌 NHEJ 途径将有助于深入了解分枝杆菌修复机制, 深化对其基本生物学功能的认识。基于 CRISPR-NHEJ 基因组编辑技术的开发及优化研究也将极大促进分枝杆菌的基础研究, 有助于抗菌新方法的开发。

作者贡献声明

向莎莎: 文章撰写, 图片绘制; 黄煜: 稿件润色修改; 谢建平: 稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BURMA S, CHEN BPC, CHEN DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity[J]. *DNA Repair*, 2006, 5(9/10): 1042-1048.
- [2] CECCALDI R, RONDINELLI B, D'ANDREA AD. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break[J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(1): 52-64.
- [3] SHRIVASTAV M, de HARO LP, NICKOLOFF JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice[J]. *Cell Research*, 2008, 18(1): 134-147.
- [4] THOMPSON LH, SCHILD D. Recombinational DNA repair and human disease[J]. *Mutation Research*, 2002, 509(1/2): 49-78.
- [5] SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, WILLIS NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(11): 698-714.
- [6] CHIRUVELLA KK, LIANG ZB, WILSON TE. Repair of double-strand breaks by end joining[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(5): a012757.
- [7] PASTWA E, BŁASIAK J. Non-homologous DNA end joining[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2003, 50(4): 891-908.
- [8] OH JM, MYUNG K. Crosstalk between different DNA repair pathways for DNA double strand break repairs[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2022, 873: 503438.
- [9] DUDÁS A, CHOVANEC M. DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. *Mutation Research*, 2004, 566(2): 131-167.
- [10] KOWALCZYKOWSKI SC, DIXON DA, EGGLESTON AK, LAUDER SD, REHRAUER WM. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. *Microbiological Reviews*, 1994, 58(3): 401-465.
- [11] LONG QX, DU QL, FU TW, DRILICA K, ZHAO XL, XIE JP. Involvement of Holliday junction resolvase in fluoroquinolone-mediated killing of *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(3): 1782-1785.
- [12] SONODA E, HOCHEGGER H, SABERI A, TANIGUCHI Y, TAKEDA S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair[J]. *DNA Repair*, 2006, 5(9/10): 1021-1029.
- [13] 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[J]. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1365-1374.
- [14] DOHERTY AJ, JACKSON SP, WELLER GR. Identification of bacterial homologs of the Ku DNA repair proteins[J]. *FEBS Letters*, 2001, 500(3): 186-188.
- [15] GONG CL, MARTINS A, BONGIORNO P, GLICKMAN M, SHUMAN S. Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(20): 20594-20606.
- [16] PITCHER RS, BRISSETT NC, DOHERTY AJ. Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 259-282.
- [17] MEEK K, GUPTA S, RAMSDEN DA, LEES-MILLER SP. The DNA-dependent protein kinase: the director at the end[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 200: 132-141.
- [18] DELLA M, PALMBOS PL, TSENG HM, 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[J]. *Science*, 2004, 306(5696): 683-685.
- [19] SOWA DJ, WARNER MM, TETENYCH A, KOEHLIN L, BALARI P, RASCON PEREZ JP, CABA C, ANDRES SN. The *Mycobacterium tuberculosis* Ku C-terminus is a multi-purpose arm for binding DNA and LigD and stimulating ligation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(19): 11040-11057.
- [20] FULNEČEK J, KLIMENTOVÁ E, CAIRO A, BUKOVČAKOVA SV, ALEXIOU P, PROKOP Z, RIHA K. The SAP domain of Ku facilitates its efficient loading onto DNA ends[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(21): 11706-11716.
- [21] ABBASI S, PARMAR G, KELLY RD, BALASURIYA N, SCHILD-POULTER C. The Ku complex: recent advances and emerging roles outside of non-homologous end-joining[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(10): 4589-4613.
- [22] ZHAO XK, DUAN XK, DAI YD, ZHEN JF, GUO JH, ZHANG K, WANG XY, KUANG ZM, WANG H, NIU JJ, FAN L, XIE JP. *Mycobacterium* Von Willebrand factor protein MSMEG_3641 is involved in biofilm formation and intracellular survival[J]. *Future Microbiology*, 2020, 15: 1033-1044.
- [23] BOWATER R, DOHERTY AJ. Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous

- end-joining[J]. PLoS Genetics, 2006, 2(2): e8.
- [24] KUSHWAHA AK, GROVE A. *Mycobacterium smegmatis* Ku binds DNA without free ends[J]. The Biochemical Journal, 2013, 456(2): 275-282.
- [25] McGOVERN S, BACONNAIS S, ROBLIN P, NICOLAS P, DREVET P, SIMONSON H, PIÉTREMENT O, CHARBONNIER JB, Le CAM E, NOIROT P, LECOINTE F. C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(10): 4785-4806.
- [26] CUI YL, DONG HN, MA YY, ZHANG DW. Strategies for applying nonhomologous end joining-mediated genome editing in prokaryotes[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(10): 2194-2202.
- [27] BERTRAND C, THIBESSARD A, BRUAND C, LECOINTE F, LEBLOND P. Bacterial NHEJ: a never ending story[J]. Molecular Microbiology, 2019, 111(5): 1139-1151.
- [28] ZHU H, NANDAKUMAR J, ANIUKWU J, WANG LK, GLICKMAN MS, LIMA CD, SHUMAN S. Atomic structure and nonhomologous end-joining function of the polymerase component of bacterial DNA ligase D[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(6): 1711-1716.
- [29] ZHU H, SHUMAN S. Novel 3'-ribonuclease and 3'-phosphatase activities of the bacterial non-homologous end-joining protein, DNA ligase D[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(28): 25973-25981.
- [30] ANIUKWU J, GLICKMAN MS, SHUMAN S. The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends[J]. Genes & Development, 2008, 22(4): 512-527.
- [31] ZHU H, SHUMAN S. Bacterial nonhomologous end joining ligases preferentially seal breaks with a 3'-OH monoribonucleotide[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(13): 8331-8339.
- [32] [32] HOFF G, BERTRAND C, ZHANG LL, PIOTROWSKI E, CHIPOT L, BONTEMPS C, CONFALONIERI F, McGOVERN S, LECOINTE F, THIBESSARD A, LEBLOND P. Multiple and variable NHEJ-like genes are involved in resistance to DNA damage in *Streptomyces ambofaciens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1901.
- [33] 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[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2005, 12(4): 304-312.
- [34] BHATTARAI H, GUPTA R, GLICKMAN MS. DNA ligase C1 mediates the LigD-independent nonhomologous end-joining pathway of *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(19): 3366-3376.
- [35] 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[J]. Science, 2002, 297(5587): 1686-1689.
- [36] WRIGHT DG, CASTORE R, SHI RH, MALLICK A, ENNIS DG, HARRISON L. *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium marinum* non-homologous end-joining proteins can function together to join DNA ends in *Escherichia coli*[J]. Mutagenesis, 2017, 32(2): 245-256.
- [37] WANG HC, PERRAULT AR, TAKEDA Y, QIN W, WANG HY, ILIAKIS G. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(18): 5377-5388.
- [38] UEMATSU N, WETERINGS E, YANO KI, MOROTOMI-YANO K, JAKOB B, TAUCHER-SCHOLZ G, MARI PO, van GENT DC, CHEN BPC, CHEN DJ. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks[J]. The Journal of Cell Biology, 2007, 177(2): 219-229.
- [39] LIEBER MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(1): 1-5.
- [40] AHNESORG P, SMITH P, JACKSON SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining[J]. Cell, 2006, 124(2): 301-313.
- [41] NICK MCELHINNY SA, SNOWDEN CM, McCARVILLE J, RAMSDEN DA. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(9): 2996-3003.
- [42] YAMTICH J, SWEASY JB. DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2010, 1804(5): 1136-1150.
- [43] MA YM, LU HH, TIPPIN B, GOODMAN MF, SHIMAZAKI N, KOIWA O, HSIEH CL, SCHWARZ K, LIEBER MR. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining[J]. Molecular Cell, 2004, 16(5): 701-713.
- [44] WU JH, SONG LW, LU MJ, GAO Q, XU SF, ZHOU PK, MA T. The multifaceted functions of DNA-PKcs: implications for the therapy of human diseases[J]. MedComm, 2024, 5(7): e613.
- [45] PITCHER RS, TONKIN LM, GREEN AJ, DOHERTY AJ. Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 351(3): 531-544.
- [46] MATTHEWS LA, SIMMONS LA. Bacterial nonhomologous end joining requires teamwork[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(19): 3363-3365.
- [47] dos VULTOS T, MESTRE O, TONJUM T, GICQUEL B. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis* revisited[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(3): 471-487.
- [48] SINHA KM, STEPHANOU NC, GAO F, GLICKMAN MS, SHUMAN S. Mycobacterial UvrD1 is a Ku-dependent DNA helicase that plays a role in multiple DNA repair events, including double-strand break repair[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(20): 15114-15125.
- [49] CHADDA A, KOZLOV AG, NGUYEN B, LOHMAN TM, GALBURT EA. *Mycobacterium tuberculosis* Ku stimulates multi-round DNA unwinding by UvrD1

- monomers[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2024, 436(2): 168367.
- [50] LI ZD, WEN JK, LIN YN, WANG SH, XUE P, ZHANG ZP, ZHOU Y, WANG X, SUI L, BI LJ, ZHANG XN. A Sir2-like protein participates in mycobacterial NHEJ[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20045.
- [51] ZHOU Y, CHEN T, ZHOU L, FLEMING J, DENG JY, WANG XD, WANG LW, WANG YY, ZHANG XL, WEI WJ, BI LJ. Discovery and characterization of Ku acetylation in *Mycobacterium smegmatis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(6): fnu051.
- [52] GUPTA R, BARKAN D, REDELMAN-SIDI G, SHUMAN S, GLICKMAN MS. Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(2): 316-330.
- [53] HOFF G, BERTRAND C, PIOTROWSKI E, THIBESSARD A, LEBLOND P. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 5272.
- [54] SHIBATA A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks[J]. *Mutation Research*, 2017, 803/804/805: 51-55.
- [55] SINHA KM, UNCIULEAC MC, GLICKMAN MS, SHUMAN S. AdnAB: a new DSB-resecting motor-nuclease from mycobacteria[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(12): 1423-1437.
- [56] YAN MY, LI SS, DING XY, GUO XP, JIN Q, SUN YC. A CRISPR-assisted nonhomologous end-joining strategy for efficient genome editing in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02364-19.
- [57] SHEN M, ZHANG H, SHEN W, ZOU Z, LU S, LI G, HE X, AGNELLO M, SHI W, HU F, LE S. *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(9): 4505-4514.
- [58] PŁOCIŃSKI P, BRISSETT NC, BIANCHI JL, BRZOSTEK A, KORYCKA-MACHAŁA M, DZIEMBOWSKI A, DZIADEK J, DOHERTY AJ. DNA Ligase C and Prim-PolC participate in base excision repair in mycobacteria[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1251.
- [59] BERNHEIM A, CALVO-VILLAMAÑÁN A, BASIER C, CUI L, ROCHA EPC, TOUCHON M, BIKARD D. Inhibition of NHEJ repair by type II: a CRISPR-Cas systems in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2094.
- [60] ARSLAN Z, WURM R, BRENER O, ELLINGER P, NAGEL-STEGE R, OESTERHELT F, SCHMITT L, WILLBOLD D, WAGNER R, GOHLKE H, SMITS SHJ, PUL U. Double-strand DNA end-binding and sliding of the toroidal CRISPR-associated protein Csn2[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(12): 6347-6359.
- [61] 殷亮, 宣慧娟, 鲁琳, 杨志伟. 原核生物的 NHEJ 修复途径[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 1-6.
- YIN L, XUAN HJ, LU L, YANG ZW. Non-homologous End Joining pathway in prokaryotic cells[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 1-6 (in Chinese).
- [62] PITCHER RS, TONKIN LM, DALEY JM, PALMBOS PL, GREEN AJ, VELTING TL, BRZOSTEK A, KORYCKA-MACHALA M, CRESAWN S, DZIADEK J, HATFULL GF, WILSON TE, DOHERTY AJ. Mycobacteriophage exploit NHEJ to facilitate genome circularization[J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(5): 743-748.
- [63] HE LM, FAN XY, XIE JP. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-cas[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(7): 2464-2473.
- [64] HUANG QQ, LUO HP, LIU MQ, ZENG J, ABDALLA AE, DUAN XK, LI QM, XIE JP. The effect of *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated Cas2 (Rv2816c) on stress response genes expression, morphology and macrophage survival of *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 40: 295-301.
- [65] 曲芸墨, 丁鑫园, 闫玫漪, 郭晓鹏, 孙义成. CRISPR 基因组编辑技术在结核分枝杆菌中的研究进展及应用[J]. *中国防痨杂志*, 2023, 45(2): 208-214.
- Qu YM, Ding XY, Yan MY, Guo XP, Sun YC. Development and application of CRISPR assisted genome editing technology in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2023, 45(2): 208-214 (in Chinese).
- [66] JIANG WY, BIKARD D, COX D, ZHANG F, MARRAFFINI LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [67] MALI P, ESVELT KM, CHURCH GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 957-63.
- [68] Zheng X, Li SY, Zhao GP, Wang J. An efficient system for deletion of large DNA fragments in *Escherichia coli* via introduction of both Cas9 and the non-homologous end joining system from *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 485(4): 768-774.
- [69] CUI L, BIKARD D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(9): 4243-4251.
- [70] LI L, WEI KK, ZHENG GS, LIU XC, CHEN SX, JIANG WH, LU YH. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): e00827-18.