

特约综述



孟飞龙博士, 2015年9月起, 任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员、博士生导师、研究组长。该实验室主要通过生物化学、遗传学、免疫学和功能组学等方法研究B淋巴细胞中抗体基因多样化调控机制以及相关免疫缺陷疾病和淋巴瘤基因组不稳定性的机制。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=164>.

抗体多样化及相关免疫系统疾病研究进展

刘婷婷 孟飞龙*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 在应对复杂生存环境内各种病原体入侵过程中, 人体获得性免疫系统能够产生多样化的抗原识别分子, 特异地识别与有选择地清除外来病原体。在B细胞介导的体液免疫应答中, 抗体基因需经历一系列的程序性DNA断裂、重排和突变等过程, 从而编码抗原特异性的抗体分子。抗体类型转换是抗体多样化中的重要一环。其中, B细胞特异性胞苷去氨酶AID(activation-induced deaminase)起始了抗体类型转换过程, 而DNA损伤修复系统则最终完成了DNA重排, 使B细胞表达其他类型的抗体。这一过程的缺陷将导致原发性免疫缺陷疾病, 而失调又可能导致B细胞淋巴瘤的发生。该文将介绍抗体多样化过程, 着重讨论抗体类型转换的分子机制以及各个水平的精细调控, 并针对相关免疫系统疾病展望可能的诊断和治疗手段。

关键词 B淋巴细胞; 抗体多样化; 免疫缺陷; 淋巴瘤; DNA损伤修复

Antibody Diversification and Related Diseases

Liu Tingting, Meng Feilong*

(*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

Abstract To fight diverse pathogens, one hallmark of adaptive immune system is the generation of diverse antigen receptors, including B cell receptor or also known as immunoglobulin (Ig)/antibody. The generation of antibody repertoire in B lymphocytes requires several antibody gene diversification processes at genomic DNA level, which involve programmed DNA breakage, rearrangement and/or mutations. Among these processes,

*通讯作者。Tel: 021-54921620, E-mail: feilong.meng@sibcb.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921620, E-mail: feilong.meng@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2016-05-20 09:17:35

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160520.0917.002.html>

antibody class switch recombination (CSR) allows antibody to switch from IgM to other Ig isotypes, and is initiated by a B cell specific activation-induced deaminase (AID). The deamination products on genomic DNA are further processed into double-strand breaks (DSBs), which activate general DNA repair pathways. Deficiency of CSR factors is the major cause of primary immunodeficiency e.g. hyper-IgM syndrome, while the dysregulation of CSR could result in B cell lymphomas. We review the molecular mechanism of CSR with a focus on how CSR is tightly controlled, and also discuss implications to immunodeficiency/cancer diagnosis and treatment.

Keywords B lymphocyte; antibody diversification; immunodeficiency; B cell lymphoma; DNA repair

在复杂的生存环境中,生物体面临着各种外来物的入侵。高等动物的体液免疫系统是对抗外来入侵物的重要一环,其中B淋巴细胞分泌的特异性抗体是最关键的分子。为应对多种多样的病原体,抗体基因需要经历一系列程序性的DNA断裂、重排和突变过程,最终编码抗原特异性的高效力抗体分子。在B细胞发育成熟过程中,抗体多样化受到严格的精细调控,这一过程的失调会导致一系列的免疫系统疾病,如原发性免疫缺陷、B细胞淋巴瘤等。本文将介绍抗体多样化过程,着重讨论抗体类型转换的研究进展,并在总结相关疾病的发病机理的基础上展望诊断和治疗的可能方案。

1 抗体结构及多样化过程

1.1 抗体结构及类型

抗体,即免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig),一般由两条相同的重链(IgH)和两条相同的轻链(IgL)组成。在三维结构上,抗体分子又可以分为一系列的免疫球蛋白结构域。抗体N-端结构域由基因组上的不同片段通过V(D)J重排而产生,其氨基酸序列各异,又被称为可变区(variable region)。抗体可变区形成了抗原结合位,决定了抗体的特异性。而C-端免疫球蛋白结构域由于其序列相对恒定,则被称为恒定区(constant region)(图1A)。小鼠B细胞有八种不同的重链恒定区基因($C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\gamma3$ 、 $C\gamma1$ 、 $C\gamma2b$ 、 $C\gamma2a$ 、 $C\epsilon$ 和 $C\alpha$)和两种不同的轻链基因(κ 和 λ)^[1]。根据其重链恒定区,小鼠抗体可以分为IgM、IgD、IgG3、IgG1、IgG2b、IgG2a/c、IgE和IgA等类型(class/isotype)。不同类型的抗体可以和不同的下游免疫反应分子相结合,激活各种免疫反应。例如,IgM以五聚体或六聚体的形式存在,对于有重复序列的抗原具有高亲和力,可以调节补体的激活途径。由于它

的大分子结构,IgM主要存在于血管内。IgG是循环系统中主要的抗体分子,分布于全身免疫系统;IgA则在黏膜免疫中发挥主要作用。重链恒定区基因包括若干个外显子,通过不同的mRNA剪切方式,可以表达分泌型的蛋白,即抗体或膜结合型的蛋白,即B细胞表面受体(B cell receptor, BCR)^[2]。

1.2 抗体基因多样化过程

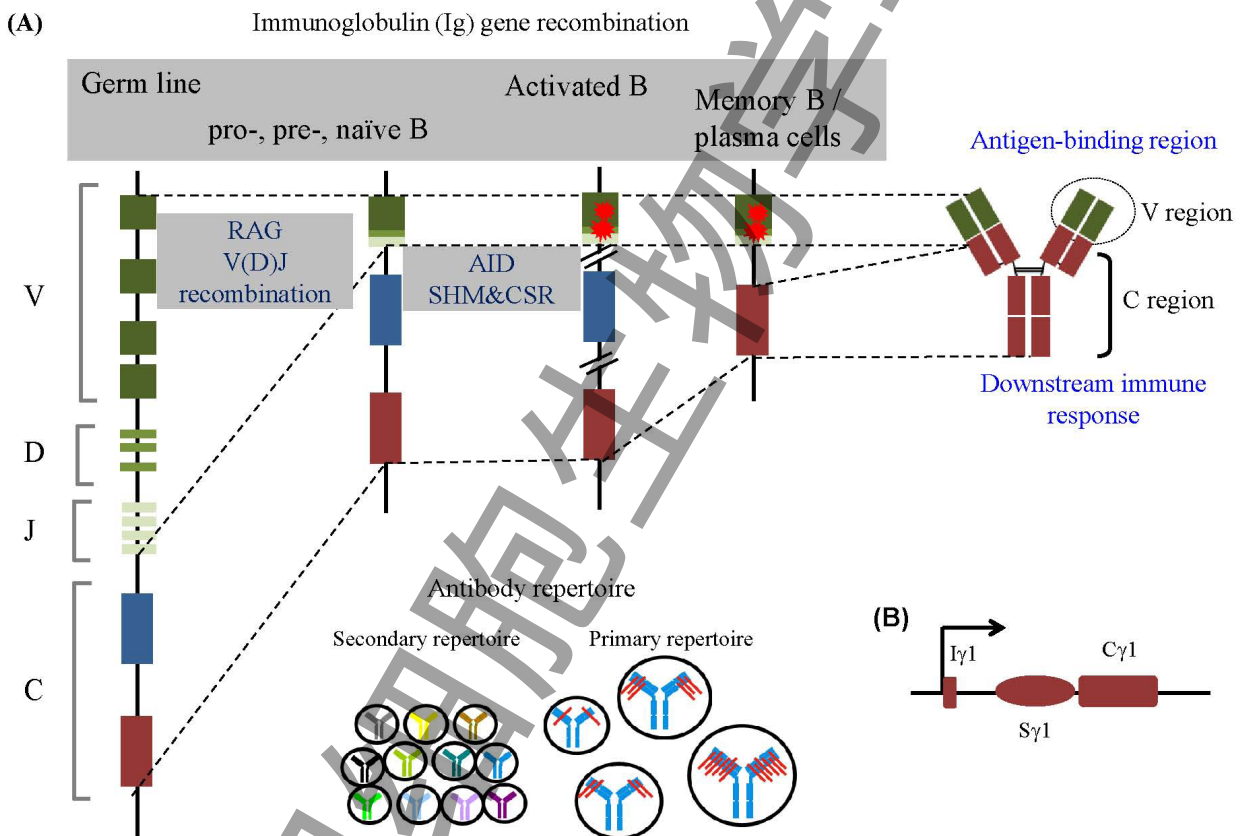
在不同的生存环境中免疫系统面临着各种各样病原体的入侵,这就需要免疫系统可以表达识别不同抗原的抗体分子。特定B细胞群体产生的抗体总和,也被称为抗体库(antibody repertoire)。在哺乳动物中,抗体库的形成即抗体多样化主要分为两个阶段:(1)在B细胞发育早期祖B细胞(pro-B)、前体B细胞(pre-B)中,V(D)J重排可以将不同的基因片段拼接,从而在成熟B细胞中形成主要由亲和力较低的IgM型抗体分子构成的初始抗体库^[3];(2)在外周淋巴系统中,受到抗原激活的成熟B细胞,可以经历体细胞高频突变(somatic hypermutation, SHM)和抗体类型转换(class switch recombination, CSR)进一步形成由高亲和力不同抗体类型分子构成的抗体库^[4](图1A)。

编码抗体可变区的DNA区域包括V元件(variable elements)和J元件(joining elements)以及重链中的D元件(diversity elements)^[5]。轻链的V元件和J元件以及重链的V、D、J三个元件可以进行组合和连接从而形成不同的抗体可变区基因。重链中的V元件(V_H)组成了重链区大部分可变区域基因,包括前两个抗原互补决定区(complementary determinant region, CDR)^[6-7];D元件(D_H)是由10~15个核苷酸序列组成的小片段,在抗体多样性过程中具有重要作用,部分V和D、J元件构成了重链第三个互补决定区3(CDR3)^[8]。这一V(D)J重排过程由序列特异性DNA

内切酶RAG1/2复合体起始, 并由非同源重组DNA末端连接途径最终连接完成^[9]。

在外周淋巴组织中的静息态成熟B细胞, 受到抗原的刺激后, 能够在T细胞等细胞的辅助下形成临时性免疫结构——生发中心(germinal centers, GCs)^[10]。在生发中心B细胞中, 抗体基因进一步经历两种多样化的过程: 抗体可变区的高频突变和抗体重链恒定区的类型转换^[11]。在高频突变过程中, B细胞能够改变抗体可变区基因编码序列, 从而在细胞表面

表达不同的抗体分子, 即B细胞受体。生发中心B细胞受体竞争性结合T细胞表面抗原复合物分子, 而表达高亲和力B细胞受体的B细胞得到生存^[11]。这一过程最终产生了高亲和力的抗体, 也被称为抗体亲和力成熟(affinity maturation)^[12]。在抗体类型转换过程中, 恒定区基因产生DNA双链断裂。不同恒定区的DNA双链断裂最终相互连接, 从而将下游的恒定区基因与可变区基因外显子连接起来。这一过程最终将B细胞受体从IgM转换成了其他类型的Ig^[13-15]。



A: 典型的抗体分子由重链和轻链组成, 形成的免疫球蛋白结构域又可以分为可变区和恒定区, 分别负责抗原的结合和下游免疫反应的激活。在B细胞发育早期阶段, 编码可变区的V元件、J元件, 以及重链可变区特有的D元件, 可以通过核酸内切酶RAG起始的V(D)J重排进行组合和连接从而形成可变区基因外显子, 所分泌的低亲和力IgM抗体构成了初始的抗体库。在外周淋巴组织结构生发中心中, AID能够起始可变区高频突变和重链恒定区抗体类型转换, 从而形成了表达高亲和力不同抗体类型的抗体库。B: 抗体重链恒定区基因转录结构单元。主要包括启动子(I promoter), 非编码外显子“P”, 包含S区的内含子, 以及若干编码抗体蛋白的外显子。

A: typical antibody is composed of immunoglobulin heavy and light chains, which together form several immunoglobulin domains. The variable region domains bind antigen, while the constant region domains can activate downstream effectors. Variable region exon is assembled during B cell development via RAG initiated V(D)J recombination, during which Variable (V), Diversity (D) and Joining (J) gene segments are put together. V(D)J recombination results to the primary antibody repertoire in naïve B cells, which contains low affinity IgM antibodies. When naïve B cells migrate into peripheral lymphoid tissues, they can be activated to form germinal centers with help of T cells. In germinal centers, AID initiates somatic hyper-mutation and IgH class switch recombination, which further diverse the antibody sequences and form secondary antibody repertoire composing high affinity antibody with various antibody classes. B: A transcription unit of IgH constant gene contains I promoter, non-coding I exon, S region, and several coding exons.

图1 典型的抗体分子和抗体多样化过程

Fig.1 Antibody and antibody diversification

最终, 生发中心B细胞进一步分化成为记忆B细胞(memory B cells)或者浆细胞(plasma cells)。

2 抗体类型转换的分子机制

抗体类型转换是抗体多样化过程中的重要一步, 其产生的不同类型抗体能够激活不同的下游免疫反应。B细胞特异性DNA去氨酶AID(activation-induced cytidine deaminase)起始了这一过程, 产生的DNA断裂则由细胞内DNA损伤修复系统进一步连接完成整个过程。遗传学证据清晰地表明, 抗体类型转换由两步组成^[16]: 第一步, AID介导的双链DNA断裂的产生; 第二步, 双链DNA断裂激活DNA损伤应答机制将两个双链DNA断裂连接起来。

2.1 AID靶向基因组DNA底物引起双链DNA断裂的机制

B淋巴细胞特异性的胞苷去氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)起始了抗体可变区的高频突变和重链恒定区的类型转换这两种截然不同的过程。AID属于APOBEC(apolipoprotein B mRNA-editing, catalytic polypeptide)胞苷去氨酶家族, 能够将单链DNA上的胞苷(C)残基脱氨产生尿苷(U)^[17](图2A)。AID基因突变影响了正常的抗体类型转换而表现高IgM免疫缺陷征, 同时由于抗体可变区高频突变过程缺陷而使抗体亲和力受到影响^[18]。在DNA一级序列上, AID更倾向作用于WRCH(W=A/T, H=T/C/A, R=A/G)序列中的胞苷(C)^[19]。在不同的WRCH序列中, 由于AGCT回文序列中正向和反向单链DNA序列都可以被AID脱氨, 它也成为AID最倾向的底物^[20-21]。但WRCH序列模式遍布于整个基因组中。AID如何特异性地作用于抗体基因区域是长期困扰本领域的问题, 也是研究的热点之一。

2.1.1 基因转录为AID提供了单链DNA底物 AID去氨基作用于胞嘧啶的N4位点, 由于胞嘧啶的N4参与了双链DNA氢键结合, AID只能对单链DNA发挥去氨基作用^[18,22], 因此, 双链DNA必须转换为单链DNA才能使AID发挥其功能。在AID发现不久, 研究人员就发现, AID能够和RNA转录复合物RNA聚合酶II(RNA polymerase II, Pol II)相互作用^[23]。在抗体类型转换中, 重链恒定区基因若干外显子和内含子构成了一个转录单元, 其中主要包括启动子(I

promoter), 非编码外显子“T”, 包含S区的内含子以及若干编码抗体蛋白的外显子(图1B)。在正常生理状态下, 在其他细胞如T细胞分泌的细胞因子或细胞表面分子的刺激下, B细胞能够激发I启动子转录而转换成表达相应抗体类型的激活态B细胞。如, CD40L/IL4可使B细胞从表达IgM向表达IgG1、IgE转换^[24], IFN- γ (interferon- γ)使表达IgM的B细胞转换成表达IgG2a/c的B细胞^[25], TGF- β (transforming growth factor- β)可以刺激使表达IgM的B细胞转换成表达IgA的B细胞^[26]。该转录单元从I外显子起始, 结束于可以编码抗体蛋白的外显子。其转录生成的RNA并不编码任何蛋白, 被称为GLT(germ line transcript)^[27-28], 也是最早发现的非编码RNA之一。GLT是抗体类型转换发生所必需的。I启动子的缺失导致对应抗体类型转换缺陷^[29-31], 而用遗传学方法将不同的I启动子替换基因组上其他的I启动子可以激活非生理状态的抗体类型转换^[32]。同样, 调控I启动子的转录因子缺失也可以影响相应抗体类型的转换^[33-35]。在转录过程中, DNA模板链的8~9个碱基松散开来形成一个转录泡, 从而使非模板链成为单链^[36]。另外, Pol II转录复合物转录后产生的负超螺旋结构(negative supercoiling)也可以促进DNA的解链^[37], 然而, 这些DNA双链的解链现象是瞬时的, AID理论上只能在ssDNA产生的一瞬间结合到其靶位点并发挥作用^[38-39](图2B和图2C)。

2.1.2 S区DNA高级结构为AID提供了稳定的单链DNA底物 在体外培养条件下, 细胞因子激活的B细胞中, AID可以特异性靶向抗体重链恒定区的S区, 并在S区引起抗体类型转换需要的DNA断裂^[40]。哺乳动物S区主要由富含GC的重复序列组成, 并可以长达10 Kb以上^[21,41-42], 其中非模板链富含鸟苷(G)。由于其序列特殊性, 体外转录的S区DNA序列可以形成稳定的R-loop结构, 即转录的模板链和转录产物RNA相互紧密结合形成DNA-RNA双链结构, 而非模板链则以单链DNA或G4 DNA的形式存在^[43](图2D)。同样, 在细胞内也可以检测到稳定的S区R-loop结构。特定S区的敲除会影响对应的抗体类型转换^[21,41-42], 而且其他非重复序列也完全无法替代S区DNA的作用^[44]。将小鼠S区序列反转后, 由于反转S区不能转录形成R-loop结构, 导致抗体类型转换

的缺陷^[41]。这一结果提示, R-loop的形成是AID靶向底物所必需的。但在同样的实验中, 抗体类型转换并没有完全缺失^[41]。另外, 两栖类动物S区DNA含有大量重复序列但并不富含GC碱基, 并不能形成稳定的R-loop结构。在转基因小鼠中, 两栖动物S区可以实现部分抗体类型转换功能^[44], 这一结果提示, S区还存在着除R-loop外其他特征或其他因子帮助招募AID。哺乳动物和两栖动物的S区的另一个特点是它们都包含大量的WRCH序列。这些大量WRCH序列招募AID的机制并不清楚。其中, 染色质免疫沉淀研究发现, 小鼠S区存在着大量的Pol II和转录延伸因子5(transcription elongation factor 5, Spt5)的积累和停滞^[45], 提示转录停滞可能招募了AID或为AID提供了单链DNA底物。

2.1.3 辅助蛋白因子调控了AID在基因组DNA底物上活性

体外重组AID活性的生物化学研究显示, 单链结合蛋白RPA(replication protein A)可以促进AID对非模板链的脱氨基作用^[46]。在细胞内或体外重组体系中, RPA复合物中的RPA32亚基和AID相互作用, RPA复合物可以稳定DNA转录过程中形成的非模板链单链DNA, 为AID提供单链底物^[46-47]。AID和RPA相互作用依赖于蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)介导的AID蛋白第38位丝氨酸磷酸化^[46,48]。小鼠遗传学模型表明, S38A的突变可以阻断内源AID和RPA的结合, 从而影响CSR(class switch recombination)和SHM(somatic hypermutation)的发生, 但这个过程并不影响AID在体外系统中对于单链DNA的去氨基酶活性^[48-50]。R-loop和RPA都可以为AID提供非模板链DNA单链底物, 但在体外重组生化体系中并不能帮助AID修饰模板链DNA^[18,48]。这种非对称的去氨基作用与体内CSR和SHM过程中AID作用的模式不同, 在细胞内AID可作用于转录的DNA的两条链^[51]。进一步的生物化学实验发现, RNA外切酶复合体可以为AID提供模板和非模板DNA底物^[52]。RNA外切酶复合体(RNA exosome)是一种多亚基复合体, 它可以从3'端水解各种RNA分子, 特别是非编码RNA^[53]。AID与RNA外切酶复合体相互作用, 在不需要R-loop和RPA的情况下, 可以与转录复合物中的DNA进行去氨基反应^[52](图2E)。虽然RNA外切酶复合体的核酸

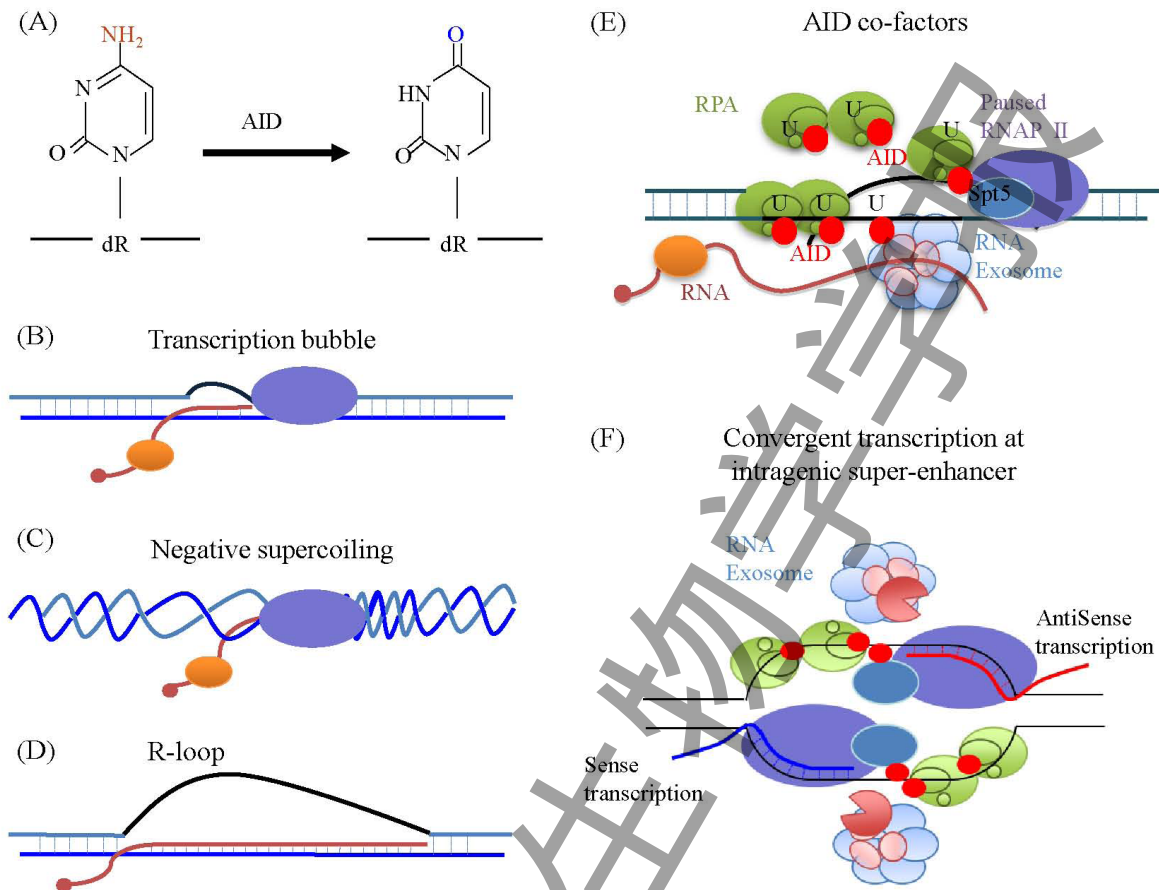
酶亚基在体外并不发挥作用, 但它在体内仍有可能通过降解转录产物而发挥作用。这一结果揭示了非编码RNA在抗体类型转换中的可能功能。

2.1.4 对向转录招募AID到基因组上

基因转录时产生的单链DNA是AID去氨基必需的, 但是并不是所有转录的基因都会被AID修饰。在抗体基因之外, AID同样可以修饰转录组中很少一部分基因, 而这些基因往往都是细胞增殖和命运决定重要的原癌基因(proto-oncogene)。在一些B细胞淋巴瘤发生中, AID造成原癌基因突变或者引起染色体转位, 导致癌基因(oncogene)的过量表达, 从而表现为淋巴瘤的恶化。AID脱靶序列并没有显著的DNA一级序列特征, 因此近年的研究集中于寻找与AID脱靶热点对应的相关表观遗传和转录组学标记^[54]。多种不同的组学手段被用来鉴定AID脱靶热点, 其中基因组高通量染色体转位测序方法(high throughput genomic translocation sequencing, HTGTS)可以定义AID脱靶热点并定量地衡量AID脱靶活性^[55]。GRO-seq(global run-on sequencing)和组蛋白修饰ChIP-Seq方法发现, 绝大多数的AID靶向热点区域都集中在位于基因内部的超级增强子(intragenic super-enhancer)区域^[54]。这些区域的一个重要特征是含有增强子和基因的对向转录(convergent transcription), 而RNA外切酶复合体在降解增强子RNA(enhancer RNA, eRNA)中起到了主要作用。进一步的研究发现, 这一机制同时适用于其他细胞系, 并同样适用于人B细胞淋巴瘤发生过程^[54]。因为超级增强子控制了B淋巴细胞特异性原癌基因的表达, 这一结果也解释了为什么AID靶点往往能够调控致癌基因的过表达或失调。在对向转录过程中, Pol II复合体对向而行, 但不能跨过对方, 因此可以产生转录复合物积累并招募AID, 理论上可以为AID提供单链DNA底物^[54](图2F)。

2.1.5 AID去氨产物通过碱基切除修复或错配修复转化为双链DNA断裂(double strand breaks, DSBs)

在抗体类型转换中, AID特异性地作用于S区, 去氨产生的尿苷经历碱基切除修复(base excision repair, BER)或错配修复(mismatch repair, MMR)产生碱基突变、片段缺失或双链DNA断裂^[56-57]。其中, 在AGCT回文序列上, 碱基切除修复形成的两个单链



A: AID去氨基酶活性示意图。AID作用于N4位点, 能够将单链DNA上的胞苷(C)残基脱氨产生尿苷(U); B、C、D: 基因组转录过程中产生的转录泡、负超螺旋结构以及R-环可以提供单链DNA招募AID; 深色线条和浅色线条分别代表DNA双链的模板链和非模板链, 红线代表RNA转录产物。E: AID相互作用因子RPA复合体和RNA外切体复合物能够为AID提供单链DNA底物。F: 对向转录招募AID到非免疫球蛋白基因靶点: 蓝线代表转录, 红线代表反转录。

A: schematic illustration of AID deaminase activity. AID can remove the amino group at N4 position of cytosine, which convert "C" to "U" on ssDNA. B,C,D: transcription bubble (B), negative supercoil (C), and R-loop (D) might offer ssDNA for AID activity. The template and non-template DNA strands are labeled with different colors, and nascent RNA is indicated with red lines. E: AID co-factors RPA and RNA exosome complexes were also proposed to generate ssDNA substrate for AID. F: convergent transcription can recruit AID to its off-target sites. Sense and antisense transcription is labeled with blue and red lines, respectively.

图2 AID靶向机制(根据参考文献[1,4,54]修改)

Fig.2 Mechanisms of AID targeting (modified from references [1,4,54])

DNA切割由于距离较短, 理论上很容易被转换为双链DNA断裂损伤^[58]。相距较短的两个去氨产物位点, 在理论上也很容易通过错配修复产生双链DNA断裂^[58]。S区DNA中富含的AGCT回文序列使AID在S区去氨反应产物更容易转化成双链DNA断裂。碱基切除修复通路中, 尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil DNA glycosylase, UNG)可以切除去氨产物尿嘧啶, 产生脱碱基位点, 然后脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, APE)就可以清除结合在脱碱基位点5'端的磷酸二酯键^[59], 从而造

成单链DNA断裂。在碱基错配修复途径中, U:G的错配可以被错配修复蛋白识别, 并清除错配碱基附近的核苷酸残基, 形成单链DNA的断裂。相近的单链DNA断裂, 最终转化为双链DNA断裂。

2.2 双链DNA损伤修复与S区断裂末端连接

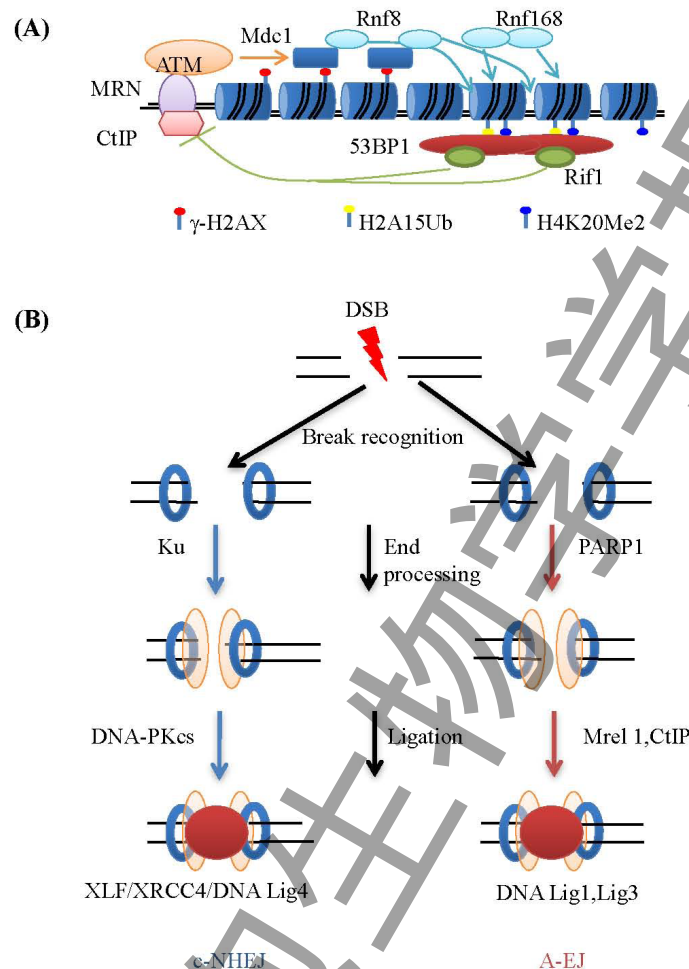
抗体类型转换中产生的S区的双链DNA断裂的修复, 并不依赖于AID去氨基酶活性。AID起始形成S区的双链DNA断裂可以激活细胞内通用的双链DNA损伤应答系统, 最终非同源DNA末端连接系统将两个S区断裂连接起来。同时, 由于S区序列以及

抗体基因区域染色质三维结构的特殊性, 抗体类型转换S区断裂末端修复也存在着与基因组其他位置DNA损伤修复的显著不同。

2.2.1 S区双链DNA损伤激活ATM依赖的双链DNA损伤应答机制 ATM(ataxia telangiectasia mutated)是一种丝氨酸/酪氨酸激酶, 属于PI3K相关激酶超家族, 该家族激酶包括ATR(ataxia telangiectasia and Rad3 related protein)、DNA-PKcs(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)等^[60]。双链DNA损伤可以招募并激活ATM激酶活性, 磷酸化多种下游蛋白包括H2AX(histone family 2A variant)、53BP1(p53 binding protein 1)等^[60]。在这种双链DNA损伤应答反应(DSB response, DSBR)中, MRE11-RAD50-NBS1(MRN)复合体可以识别DSB末端并招募ATM, ATM磷酸化组蛋白H2AX的C-末端第139位的丝氨酸, 从而形成 γ -H2AX。 γ -H2AX可以进一步招募其他双链DNA损伤应答因子, 包括MDC1(mediator of DNA damage checkpoint protein 1)^[61]。泛素连接酶RNF8(ring finger protein 8)能够与磷酸化的MDC1相互作用, 并泛素化修饰组蛋白H1^[62]。泛素连接酶RNF168(ring finger protein 168)可以识别组蛋白H1泛素化修饰, 并进一步泛素化修饰组蛋白H2A^[62]。53BP1识别组蛋白H2A泛素化修饰而进一步招募至DNA损伤位点^[62]。ATM磷酸化的53BP1能够招募Rif1(Rapl-interacting factor 1)进一步抑制由CtIP介导的双链DNA末端的单链切除(end resection), 从而使DNA断裂末端更容易被非同源DNA末端连接途径(non-homologous end joining, NHEJ)修复并同时抑制同源重组(homologous recombination)的发生^[63-64](图3A)。随着研究的深入, 更多53BP1相关因子, 如PTIP(Pax transactivation domain interacting protein)、MAD2L2(MAD2 mitotic arrest deficient-like 2, 也被称为Rev7)等被发现^[33,65-66], 目前已成为研究的热点。在ATM缺失的B细胞中, 抗体类型转换水平相对于正常细胞内抗体类型转换水平显著减少^[67]。与之类似的是, H2AX、MDC1、RNF8或RNF168的缺失都可以降低抗体类型转换水平到正常B细胞抗体类型转换水平的30%~50%。这证明了ATM依赖的双链DNA损伤修复途径在抗体类型转换中的重要作用。在这些DSBR因子中, 53BP1对于抗体类型转换

水平的作用最为显著: 53BP1缺失的B细胞中抗体类型转换水平仅为正常B细胞抗体类型转换水平的5%~10%^[68-69]。同样, 53BP1结合蛋白Rif1缺失的B细胞也表现出显著的抗体类型转换缺陷^[70], 提示了在这些突变体中DNA末端的单链切除的发生可能抑制了S区DNA末端的连接。

2.2.2 非同源DNA末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径连接两个S区DNA断裂 S区双链DNA损伤应答途径倾向性招募非同源重组末端连接途径连接两个S区DNA断裂。根据NHEJ中关键因子组分, NHEJ又可以分为经典NHEJ(classic NHEJ, c-NHEJ)通路和替代NHEJ(alternative end joining, A-EJ)通路。c-NHEJ途径在RAG-起始的V(D)J重排过程的研究中得到了详细的阐述^[71]。c-NHEJ途径中的关键因子包含: Ku70(ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70)和Ku80的异质二聚体、XRCC4(X-ray repair cross-complementing protein 4)和Lig4(DNA ligase 4)^[72]。在c-NHEJ过程中, Ku异质二聚体结合至DSB末端, 招募DNA-PKcs到DNA损伤处^[73], 最终XRCC4/Lig4复合物连接两个末端^[74]。通过对c-NHEJ缺陷的小鼠模型进行研究发现, c-NHEJ关键因子Ku70、Ku80、XRCC4或Lig4缺失成熟B细胞中抗体类型转换水平只减少至相对于野生型细胞抗体类型转换水平的30%~50%^[74], 而相同的缺失突变前体B细胞却表现出完全的V(D)J重排缺失^[4]。这一结果提示, A-EJ途径在生理条件下的抗体类型转换中发挥重要作用。不需要c-NHEJ途径中关键因子的DNA末端连接被统称为A-EJ^[75]。通过A-EJ连接的节点处(Junction)的DNA同源序列(microhomology, MH)长度通常比c-NHEJ连接节点除MH片段长, 因此DNA连接节点的同源序列长度常常被用来区分c-NHEJ和A-EJ^[74]。在野生型抗体类型转换B细胞中, S区连接节点也包含大量的MH序列, 同样提示在c-NHEJ存在的情况下A-EJ也是可以发生的^[76]。但MH序列并不是区分c-NHEJ和A-EJ的唯一标准, 因为c-NHEJ的发生通常也可以具有1~2碱基的同源序列, 而有些A-EJ连接的节点不需要任何同源序列^[77]。在Ku非依赖的A-EJ途径中, PARP1[poly(ADP-ribose) polymerase 1]可能对DSB的识别发挥重要作用^[78-79], Mre11和CtIP可能在DNA末端处理中发挥作用^[80-81]。在Lig4非依



A: ATM依赖的双链DNA损伤应答机制。MRN复合体可以识别DSB末端招募ATM并激活ATM激酶活性,使多种下游蛋白包括H2AX、53BP1等发生磷酸化。磷酸化的H2AX即 γ -H2AX可以进一步招募其他双链DNA损伤应答因子MDC1, RNF8能够与磷酸化的MDC1相互作用,并泛素化修饰组蛋白H1。RNF168可以识别组蛋白H1泛素化修饰,并进一步泛素化修饰组蛋白H2A。53BP1识别组蛋白H2A泛素化修饰而进一步招募至DNA损伤位点。ATM磷酸化的53BP1能够招募Rif1进一步抑制由CtIP介导的双链DNA末端的单链切除,从而使DNA断裂末端更容易被非同源DNA末端连接途径修复并同时抑制同源重组的发生。B: 在c-NHEJ过程中, Ku结合至DSB末端, DNA-PKcs被进一步招募至DNA的DSB上, XRCC4/Lig4复合物最终连接两个末端。A-EJ途径中, PARP1可能参与了对DSB的识别, Mre11和CtIP可能介导末端连接,最终由Lig1或Lig3进行末端连接。

A: ATM-dependent DSB response pathway. MRN complex recognizes the DSB ends, which further recruits and activates ATM kinase. ATM phosphorylates many downstream factors including H2AX, 53BP1. Phosphorylated H2AX, i.e. γ -H2AX, can further recruit other DSB response factors, e.g. MDC1. The E3 ubiquitin ligase RNF8 is recruited to DSB site via interaction with MDC1, and ubiquitinize H1. Another E3 ubiquitin ligase RNF168 recognizes ubiquitinated H1 and further ubiquitinize H2A. The dual H4K20me and H2A15Ub modifications recruit 53BP1 to the DSB sites. ATM-phosphorylated 53BP1 further recruits Rif1 and inhibits CtIP to initiate DSB end resection, thus channels DSB into NHEJ pathway instead of HR pathway. B: during c-NHEJ, Ku heterodimer binds to the DSB ends. DNA-PKcs further processed the ends and XRCC4/Lig4 complex finally ligate the two ends. During A-EJ, PARP1 may recognized the DSB, while Mre11 and CtIP may process the ends and finally Lig1 or Lig3 ligates the two ends.

图3 DNA末端修复连接途径(根据参考文献[1]修改)

Fig.3 DNA double strands break response and end repair pathways (modified from reference [1])

赖的A-EJ途径中, Lig1和Lig3可能完成DNA末端连接^[82-84](图3B)。目前,对于A-EJ机制的研究尚不清楚,其通路上的关键因子功能尚未得到详细的鉴定。有实验表明, A-EJ是一种易错连接途径,它可以导致染

色体异位^[85]。例如,在c-NHEJ缺失的B细胞中, A-EJ可以产生染色体易位(translocation),从而导致B-细胞淋巴瘤的发生^[86]。

2.2.3 染色质三维结构对末端连接的影响 完整

的抗体类型转换过程需要将上游的S μ 断裂末端与下游S区DNA断裂末端连接。S μ 距离下游S区有60~160 Kb的距离,而单独的S区大小为2~12 Kb。在抗体类型转换过程中,在同一个S区,AID可以起始若干DNA双链断裂的发生。同一个DSB的两个末端可以连接在一起,而同一个S区的两个DSB也可能被连接,从而形成S区的内部删除(internal S region deletion, ISD)^[4,87]。在约100 Kb的染色质区域,两个不同的S区DNA断裂长距离高效的连接是抗体类型转换的必要一环。染色质三维结构实验(chromosome conformation capture)发现,抗体基因恒定区染色质处于同一个高级拓扑结构内^[88],不同的I启动子可以通过与IgH3'RR超级增强子的结合而处于三维结构相邻位置^[89]。这样,理论上S μ 与下游S区在三维空间中可能非常靠近,而这种空间上的近距离可能为CSR的顺利完成提供了便利。另外,ATM依赖的DSBR因子可以在DNA断裂末端形成长达几个MB的积累^[90],因此相隔约100 Kb的两个DNA断裂末端可能存在于同一个DNA损伤修复复合体中。本组未发表数据以及其他研究表明,利用基因组编辑工具I-SceI和CRISPR-Cas9可以介导高效率的抗体类型转换^[16,91],这些结果说明长距离DNA末端高效连接并不依赖于AID,而更可能是双链DNA损伤修复系统固有特征。在抗体类型转换中,S区断裂末端的连接表现出方向性,即S μ 断裂的着丝粒末端倾向于同下游S区断裂的端粒末端连接^[92]。这种方向倾向性连接目前只发现于抗体类型转换过程中,其分子机制尚不清晰。

3 相关免疫系统疾病与研究展望

抗体多样化是哺乳动物体液免疫的重要一环,抗体产生和多样化过程的缺陷在临床上表现为各种免疫缺陷疾病,而抗体多样化的失控则可能造成B细胞淋巴瘤的产生。

生发中心B细胞中抗体类型转换和体细胞高频突变的缺陷,表现为高IgM免疫缺陷症(hyper IgM syndrome, HIGM)^[93]。其中,编码AID蛋白的基因突变会导致二型高IgM缺陷症(hyper IgM syndrome type 2, HIGM2)^[94]。高IgM免疫缺陷症患者血清中IgG缺失或水平较正常少,而IgM的水平则较高。同

时由于体细胞高频突变缺陷,部分高IgM免疫缺陷症患者产生的抗体亲和力较弱。目前,原发性免疫缺陷的主要治疗手段是采用静脉注射免疫球蛋白和骨髓移植等方法。但静脉注射免疫球蛋白治疗手段需要经常性注射且价格昂贵,而骨髓移植方法则面临着供体缺乏等困境^[95]。由于HIGM大多由单基因的突变引起,因此针对这种疾病基因治疗的方法是潜在的治疗途径之一。

抗体多样化中,抗体基因在基因组水平面临DNA修饰和损伤的发生。这种DNA水平的损伤虽然受到精细地调控,但往往也造成了基因组的不稳定性导致癌症的发生。生发中心B细胞来源的B细胞淋巴瘤中,AID起始的DNA损伤产生的染色体易位、基因突变等是癌变的主要机制之一^[96]。而在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中,细胞癌变过程中经历类似生发中心反应过程,AID起始的基因组不稳定性与该疾病的恶化存在着直接的联系^[97]。研究AID靶向机制和抗体多样化中DNA损伤修复机制,可以为生发中心来源的B细胞淋巴瘤,如滤泡型淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)、弥漫大B细胞淋巴瘤等,以及CLL的治疗和诊断提供新的思路和技术手段。

过去的几十年内,我们对抗体多样化,特别是抗体类型转换的相关机制已经有了深入的了解,但我们的认识仍然存在着大量的空白。例如,生发中心B细胞中抗体多样化的分子机制尚不明确,我们尚不能在体外模拟生发中心B细胞的生长,因此目前的抗体生产还主要依赖于模式生物;在感染性疾病中,少数病人产生稀缺广谱抗病毒抗体的机制尚不明确,HIV疫苗尚未设计成功;针对免疫缺陷疾病的基因治疗如何安全有效实施以及B细胞淋巴瘤的治疗等。这些急迫需要解决的问题都将是本领域研究的重心和热点。

参考文献 (References)

- 1 Meng FL, Alt FW, Tian M. The mechanism of IgH class switch recombination. *Mol Biol B Cell* 2014; 345-62.
- 2 Alt FW, Bothwell AL, Knapp M, Siden E, Mather E, Koshland M, *et al.* Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* 1980; 20(2): 293-301.
- 3 Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into

- gene regulation. *Cell* 2004; 116(2): 299-311.
- 4 Alt FW, Zhang Y, Meng FL, Guo C, Schwer B. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* 2013; 152(3): 417-29.
 - 5 Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 1980; 19(4): 981-92.
 - 6 Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 1987; 196(4): 901-17.
 - 7 Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 1997; 273(4): 927-48.
 - 8 Wilson IA, Stanfield RL. Antibody-antigen interactions: New structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 1994; 4(6): 857-67.
 - 9 Schatz DG, Spanopoulou E. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 290: 49-85.
 - 10 Qi H, Kastenmuller W, Germain RN. Spatiotemporal basis of innate and adaptive immunity in secondary lymphoid tissue. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 141-67.
 - 11 Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 429-57.
 - 12 Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 1-22.
 - 13 Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 655-92.
 - 14 Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(3): 205-17.
 - 15 Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 273-93.
 - 16 Hackney JA, Misaghi S, Senger K, Garris C, Sun Y, Lorenzo MN, *et al.* DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv Immunol* 2009; 101: 163-89.
 - 17 Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(3): 258-68.
 - 18 Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 2003; 422(6933): 726-30.
 - 19 Rogozin IB, Diaz M. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol* 2004; 172(6): 3382-4.
 - 20 Yu K, Lieber MR. Nucleic acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2(11): 1163-74.
 - 21 Han L, Masani S, Yu K. Overlapping activation-induced cytidine deaminase hotspot motifs in Ig class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(28): 11584-9.
 - 22 Pham P, Bransteitter R, Petruska J, Goodman MF. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 2003; 424(6944): 103-7.
 - 23 Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, Agata Y, *et al.* Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 2003; 302(5653): 2137-40.
 - 24 Hasbold J, Lyons AB, Kehry MR, Hodgkin PD. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol* 1998; 28(3): 1040-51.
 - 25 Collins JT, Dunnick WA. Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: Structure and induction by IFN-gamma. *Int Immunol* 1993; 5(8): 885-91.
 - 26 Leberman DA, Lee FD, Coffman RL. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* 1990; 144(3): 952-9.
 - 27 Lutzker S, Rothman P, Pollock R, Coffman R, Alt FW. Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line Ig gamma 2b transcripts: Evidence for directed heavy chain class switching. *Cell* 1988; 53(2): 177-84.
 - 28 Stavnezer J, Radcliffe G, Lin YC, Nietupski J, Berggren L, Sitia R, *et al.* Immunoglobulin heavy-chain switching may be directed by prior induction of transcripts from constant-region genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(20): 7704-8.
 - 29 Jung S, Rajewsky K, Radbruch A. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 1993; 259(5097): 984-7.
 - 30 Zhang J, Bottaro A, Li S, Stewart V, Alt FW. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* 1993; 12(9): 3529-37.
 - 31 Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 1994; 13(3): 665-74.
 - 32 Harriman GR, Bradley A, Das S, Rogers-Fani P, Davis AC. IgA class switch in I alpha exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J Clin Invest* 1996; 97(2): 477-85.
 - 33 Daniel JA, Santos MA, Wang Z, Zang C, Schwab KR, Jankovic M, *et al.* PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 2010; 329(5994): 917-23.
 - 34 Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, Grusby MJ, Berton MT. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol* 1998; 161(1): 302-10.
 - 35 Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schroder AJ, Canfield SM, *et al.* IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(2): 821-6.
 - 36 Nudler E. RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 335-61.
 - 37 Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(20): 7024-7.
 - 38 Shen HM, Storb U. Activation-induced cytidine deaminase(AID) can target both DNA strands when the DNA is supercoiled. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(35): 12997-3002.

- 39 Parsa JY, Ramachandran S, Zaheen A, Nepal RM, Kapelnikov A, Belcheva A, *et al.* Negative supercoiling creates single-stranded patches of DNA that are substrates for AID-mediated mutagenesis. *PLoS Genet* 2012; 8(2): e1002518.
- 40 Yu K, Chedin F, Hsieh CL, Wilson TE, Lieber MR. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol* 2003; 4(5): 442-51.
- 41 Shinkura R, Tian M, Smith M, Chua K, Fujiwara Y, Alt FW. The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol* 2003; 4(5): 435-41.
- 42 Khamlichi AA, Glaudet F, Oruc Z, Denis V, Le Bert M, Cogne M. Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* 2004; 103(10): 3828-36.
- 43 Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev* 2004; 18(13): 1618-29.
- 44 Zarrin AA, Alt FW, Chaudhuri J, Stokes N, Kaushal D, Du Pasquier L, *et al.* An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 2004; 5(12): 1275-81.
- 45 Pavri R, Gazumyan A, Jankovic M, Di Virgilio M, Klein I, Ansarah-Sobrinho C, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 2010; 143(1): 122-33.
- 46 Chaudhuri J, Khuong C, Alt FW. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 2004; 430(7003): 992-8.
- 47 Sikorski TW, Ficarro SB, Holik J, Kim T, Rando OJ, Marto JA, *et al.* Sub1 and RPA associate with RNA polymerase II at different stages of transcription. *Mol Cell* 2011; 44(3): 397-409.
- 48 Basu U, Chaudhuri J, Alpert C, Dutt S, Ranganath S, Li G, *et al.* The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 2005; 438(7067): 508-11.
- 49 Cheng HL, Vuong BQ, Basu U, Franklin A, Schwer B, Astarita J, *et al.* Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(8): 2717-22.
- 50 McBride KM, Gazumyan A, Woo EM, Schwickert TA, Chait BT, Nussenzweig MC. Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med* 2008; 205(11): 2585-94.
- 51 Liu M, Schatz DG. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol* 2009; 30(4): 173-81.
- 52 Basu U, Meng FL, Keim C, Grinstein V, Pefanis E, Eccleston J, *et al.* The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell* 2011; 144(3): 353-63.
- 53 Lykke-Andersen S, Brodersen DE, Jensen TH. Origins and activities of the eukaryotic exosome. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 10): 1487-94.
- 54 Meng FL, Du Z, Federation A, Hu J, Wang Q, Kieffer-Kwon KR, *et al.* Convergent transcription at intragenic super-enhancers targets AID-initiated genomic instability. *Cell* 2014; 159(7): 1538-48.
- 55 Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, Lewis SM, Molinie B, Ho YJ, *et al.* Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* 2011; 147(1): 107-19.
- 56 Chahwan R, Edelmann W, Scharff MD, Roa S. AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin Immunol* 2012; 24(4): 293-300.
- 57 Saribasak H, Gearhart PJ. Does DNA repair occur during somatic hypermutation? *Semin Immunol* 2012; 24(4): 287-92.
- 58 Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* 2004; 16(2): 163-71.
- 59 Kim YJ, Wilson DM 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 2012; 5(1): 3-13.
- 60 Shihoh Y. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3): 155-68.
- 61 Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001; 276(45): 42462-7.
- 62 Thorslund T, Ripplinger A, Hoffmann S, Wild T, Uckelmann M, Villumsen B, *et al.* Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 2015; 527(7578): 389-93.
- 63 Chapman JR, Barral P, Vannier JB, Borel V, Steger M, Tomas-Loba A, *et al.* RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol Cell* 2013; 49(5): 858-71.
- 64 Zimmermann M, Lottersberger F, Buonomo SB, Sfeir A, de Lange T. 53BP1 regulates DSB repair using RIF1 to control 5' end resection. *Science* 2013; 339(6120): 700-4.
- 65 Boersma V, Moatti N, Segura-Bayona S, Peuscher MH, van der Torre J, Wevers BA, *et al.* MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature* 2015; 521(7553): 537-40.
- 66 Xu G, Chapman JR, Brandsma I, Yuan J, Mistrik M, Bouwman P, *et al.* REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* 2015; 521(7553): 541-4.
- 67 Callen E, Jankovic M, Wong N, Zha S, Chen HT, Difilippantonio S, *et al.* Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell* 2009; 34(3): 285-97.
- 68 Manis JP, Morales JC, Xia Z, Kutok JL, Alt FW, Carpenter PB. 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat Immunol* 2004; 5(5): 481-7.
- 69 Ward IM, Reina-San-Martin B, Oлару A, Minn K, Tamada K, Lau JS, *et al.* 53BP1 is required for class switch recombination. *J Cell Biol* 2004; 165(4): 459-64.
- 70 Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(1): 7-18.
- 71 Deriano L, Roth DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: Alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet* 2013; 47: 433-55.
- 72 Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair

- by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 181-211.
- 73 Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72(1): 131-42.
- 74 Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M, *et al.* IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 2007; 449(7161): 478-82.
- 75 Zhang Y, Gostissa M, Hildebrand DG, Becker MS, Boboila C, Chiarle R, *et al.* The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 2010; 106: 93-133.
- 76 Boboila C, Alt FW, Schwer B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv Immunol* 2012; 116: 1-49.
- 77 Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, *et al.* Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* 2004; 14(5): 611-23.
- 78 Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, *et al.* PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(21): 6170-82.
- 79 Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 2012; 336(6081): 593-7.
- 80 Zhang Y, Jasin M. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(1): 80-4.
- 81 Zha S, Boboila C, Alt FW. Mre11: Roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(8): 798-800.
- 82 Masani S, Han L, Meek K, Yu K. Redundant function of DNA ligase 1 and 3 in alternative end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(5): 1261-6.
- 83 Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, Windhofer F, *et al.* DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 2005; 65(10): 4020-30.
- 84 Audebert M, Salles B, Calsou P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 2004; 279(53): 55117-26.
- 85 Simsek D, Jasin M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(4): 410-6.
- 86 Wang JH, Alt FW, Gostissa M, Datta A, Murphy M, Alimzhanov MB, *et al.* Oncogenic transformation in the absence of Xrcc4 targets peripheral B cells that have undergone editing and switching. *J Exp Med* 2008; 205(13): 3079-90.
- 87 Boboila C, Jankovic M, Yan CT, Wang JH, Wesemann DR, Zhang T, *et al.* Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(7): 3034-9.
- 88 Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 2014; 159(7): 1665-80.
- 89 Ju Z, Chatterjee S, Birshstein BK. Interaction between the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region and the IgH transcription unit during B cell differentiation. *Mol Immunol* 2011; 49(1/2): 297-303.
- 90 Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, *et al.* Histone H2AX: A dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* 2003; 114(3): 359-70.
- 91 Gheong TC, Compagno M, Chiarle R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 2016; 7: 10934.
- 92 Dong J, Panchakshari RA, Zhang T, Zhang Y, Hu J, Volpi SA, *et al.* Orientation-specific joining of AID-initiated DNA breaks promotes antibody class switching. *Nature* 2015; 525(7567): 134-9.
- 93 Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper-IgM(HIM). *Immunodefec Rev* 1992; 3(2): 101-21.
- 94 Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000; 102(5): 565-75.
- 95 Durandy A, Peron S, Fischer A. Hyper-IgM syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(4): 369-76.
- 96 Gostissa M, Alt FW, Chiarle R. Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 319-50.
- 97 Kasar S, Kim J, Improgo R, Tiao G, Polak P, Haradhvala N, *et al.* Whole-genome sequencing reveals activation-induced cytidine deaminase signatures during indolent chronic lymphocytic leukaemia evolution. *Nat Commun* 2015; 6: 8866.