

宿主细胞 DNA 损伤反应与重组腺 相关病毒载体基因表达

彭俊纯,刁勇,李招发,王启钊,吕颖慧

(华侨大学 生物医学学院,福建 厦门 361021)

摘要: 文中主要讨论细胞 DNA 修复机制与重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus,rAAV)载体的相互关系,探讨通过调节宿主细胞 DNA 修复机制,提高 rAAV 载体表达及基因打靶效率的方法,进而提高 rAAV 载体基因表达的可能性.

关键词: 腺相关病毒;基因治疗;DNA 损伤修复;基因打靶

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

基于腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)构建的重组腺相关病毒(rAAV)载体,因免疫源性低、致病风险小、宿主范围广,成为目前基因治疗研究的热点.以 rAAV 为载体的基因药物 Glybera 于 2012 年正式在欧盟获准上市,表明 rAAV 基因药物的临床有效性和安全性已获得认可^[1].在 rAAV 载体中,野生 AAV 的病毒基因 Rep 和 Cap 被目的基因表达框所替代,保留的病毒成分仅仅是基因组两端 145 bp 长度的反向末端重复(inverted terminal repeats,ITR)序列.rAAV 载体因不能在宿主细胞内表达 AAV 蛋白,无法有效地复制其基因组,导致转基因表达效率较低.增加 rAAV 载体用量可以提高其转基因表达水平,但人体应用后有可能诱发宿主免疫反应等毒副作用^[2-3].提高 rAAV 载体的基因表达效率,是其走向临床广泛应用的关键.rAAV 载体转导细胞的过程,包括与靶细胞表面受体的结合、受体介导的病毒内吞、内体介导胞质内运输、从内体逃逸后入核、核内脱壳释放基因组、双链形成、转录和翻译等,其中每一步骤都可能影响 rAAV 载体的表达效率.rAAV 载体的基因表达,需要宿主细胞内相关机制的积极参与.近期的研究表明:宿主细胞的 DNA 修复机制对 rAAV 的核内行为,包括基因组的双链化、环化以及染色体整合等,具有重要影响.而 rAAV 载体转基因的转录与翻译,均在细胞核内发生.因此,本文就细胞 DNA 修复机制与 rAAV 载体的相互关系进行讨论,并探讨通过调节宿主细胞 DNA 修复机制,提高 rAAV 载体基因表达的可能性.

1 DNA 损伤反应与 rAAV 核内过程

rAAV 载体作为入侵者进入宿主细胞后,首先会遭遇宿主细胞天然免疫反应的围剿^[4].rAAV 载体基因组进入细胞核后,还会受到核内 DNA 修复机制的围剿.细胞核内 DNA 的修复是真核细胞与生俱来的,实施病毒防御的机制之一.实际上,DNA 修复机制是细胞为了确保体内遗传信息的正确性,在进化过程中形成的针对所有原因导致的 DNA 损害的修复补救措施.当 rAAV 在细胞核内脱壳后,其释放的基因组 DNA 游离末端,会立刻激活 DNA 修复系统,其命运被宿主细胞所主宰.所以,rAAV 在细胞内因表达水平的高低,是其与 DNA 修复系统博弈的最终结果.

早期研究表明,DNA 修复系统对 rAAV 基因组的核内过程具有重要影响.当细胞遭遇基因毒性应

收稿日期: 2013-12-17

通信作者: 刁勇(1967-),男,教授,主要从事基因治疗的研究. E-mail:diaoyong@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家国际科技合作专项项目(2011DFG33320);国家自然科学基金资助项目(81371669,81271691,81201183);福建省自然科学基金资助项目(2012J01397)

激时,包括 UV 照射和抗癌药物处理,rAAV 载体的转导效率会显著增加^[5-6].与分裂细胞比较,非分裂细胞的转导效率促进作用更加明显.因为这些应激往往造成细胞 DNA 损伤,而 DNA 损伤又会激活 DNA 修复途径,人们推测 DNA 修复途径的激活可能促进了 rAAV 的表达活性.之后大量有关 DNA 修复与 rAAV 表达之间相互关系的深入研究,使人们对其中的分子机制有了初步认识.

1.1 rAAV 载体 DNA 的双链化

因 rAAV 基因组内只有两端 ITR 是病毒序列,不能表达其他任何病毒基因产物,rAAV 基因组的加工几乎完全依赖宿主细胞.rAAV 载体在进入细胞核后,脱壳释放出单链基因组 DNA.单链 DNA 两个游离末端的大量存在,立刻激活细胞 DNA 修复系统,随后单链基因组 DNA 被转换成为各种形式的双链 DNA^[7-8].

有证据表明,在 rAAV 入核后,细胞内 Mre11/Rad50/NBS1(MRN)复合物被激活,并与 rAAV 载体的 ITR 结合,抑制 rAAV 的转导^[9-10].已知 MRN 复合物是 DNA 同源重组修复(homologous recombination repair,HRR)机制中的重要成分^[11].HRR 是利用姐妹染色单体、或同源染色体、或 DNA 重复序列的重新组合,对双链 DNA 断裂(double-strand break,DSB)损伤进行修复的机制,多发生于细胞周期的 S/G2 期.MRN 的功能主要是检测 DSB 损伤,并利用 Mre11 内切和外切核酸酶活性处理 DNA 断裂末端,以形成可重组的 3'单链尾巴^[12].

HRR 机制中的另一成分——共济失调-毛细血管扩张突变基因(ataxia-telangiectasia mutated,ATM),也可能参与 rAAV 基因组双链转化.因为 ATM 缺陷的细胞,单链 rAAV 的转导效率显著提高^[13].然而,Cataldi 等^[14]提出,ATM 并不参与 rAAV 基因组的第二链合成.因为 ATM 缺陷的细胞,基因组是双链的自身互补型 rAAV(self-complementary rAAV,scrAAV)载体的转导效率也可以增强.因此,ATM 对 rAAV 的转导抑制,也可能是基于基因沉默机制.

另一个可以抑制 rAAV 基因组双链转化过程的因子是酪氨酸磷酸化 FKBP52,其与 ITR 结合并抑制第二链的合成^[15].T 细胞蛋白酪氨酸磷酸酶(TC-PTP)将 FKBP52 去磷酸化后,FKBP52 释放 ITR,允许 rAAV 基因组以 ITR 为引物自身合成双链^[16].催化 rAAV 基因组 DNA 第二链合成的 DNA 聚合酶是 DNA 聚合酶 δ ^[17],这是一种在 DNA 修复过程中,可弥补 DNA 单链缺口的聚合酶^[18].

1.2 rAAV 载体 DNA 的环化

在宿主细胞内,DNA 修复机制不仅介导 rAAV 基因组的双链转换,还会通过分子内或分子间 DNA 重组,将其加工成为单分子环状附加体及多分子环状附加体等形式.这些双链环状附加体的存在,对于 rAAV 的长期基因表达非常重要,因为它们可以在非分裂细胞内,以染色质的形式稳定存在^[19].

在 rAAV 基因组的环化重组过程中,ITR 元件发挥了举足轻重的作用.T 形发夹结构的 ITR 触发 DNA 损伤反应,宿主细胞迅速募集一系列的 DNA 修复蛋白,参与 rAAV 基因组的环化重组.其中包括 HRR 机制涉及的 ATM,MRN 和 Bloom 蛋白(BLM),还包括非同源末端连接(non-homologous end-joining,NHEJ)机制涉及的 DNA 蛋白依赖激酶催化亚基(DNA-PKcs),Artemis 和 Warner 蛋白(WRN)^[14,20-21].

rAAV 基因组的分子内环化重组主要依赖于 NHEJ 途径,重组 DNA 接头处存在不同程度的核苷酸缺失,与 NHEJ 介导的分子重组机制一致^[21].NHEJ 途径不需要两段 DNA 间具有严格的同源性,只是借助相关蛋白将两段 DNA 末端链接起来,在整个细胞周期都可以进行.DNA-PKcs 和 Artemis 是 NHEJ 途径 DSB 修复的 2 个主要成分.Artemis 由 DNA-PKcs 激活后,具有核酸内切酶的活性,可促使 ITR 发夹中的环和护翼结构解离,以促进双链 DNA 末端连接^[22].在没有 DNA-PKcs 或 Artemis 时,培养细胞和动物组织 rAAV 内分子的内重组会显著降低^[14,21,23].值得注意的是,NHEJ 途径可能与 rAAV 基因组的表观遗传修饰相关联^[14].通过 NHEJ 途径进行的 rAAV 基因组环化重组,产生的环化基因组表达活性高.

HRR 可能是 rAAV 分子间环化重组的主要途径,因为在缺乏 NHEJ 途径关键因子 DNA-PKcs 或 Artemis 时,分子间重组也可有效地发生^[21].对重组分子交界处的序列进行研究,发现存在长度为 165 nt 的双 D 序列 ITR 结构,这正是 HRR 的特点^[24].来自同一血清型 AAV 的同源 ITR 之间的重组,优于不同血清型 AAV 异源 ITR 之间的重组^[25],也表明这一猜测的正确性.在 DNA-PKcs 功能缺陷的 SCID

小鼠组织中,呈现 HRR 特点的 rAAV 重组比例增加,这表明在动物非分裂细胞中,在不存在 DNA-PKcs 蛋白的情况下,HRR 会代偿性激活.

BLM 和 WRN 均属于 RecQ 家族的 DNA 解旋酶成员,分别是 HRR 和 NHEJ 途径的关键因子.其主要作用均是松弛双链 DNA,以确保重组中间体的形成^[26].

1.3 rAAV 载体基因组的整合

野生型 AAV 可以依赖 Rep 蛋白,与宿主细胞染色体发生定点整合,如定点整合于人 19 号染色体 19q13.42 的 AAVS1 位点^[27].但 rAAV 不表达 Rep 蛋白,因此它缺乏定点整合到细胞基因组的能力,发生随机整合的频率一般为 rAAV 转导总量的 0.1%^[28].当宿主细胞基因组存在 DSB 损伤时,rAAV 基因组可以被细胞基因组断裂位点捕获,由 DNA 修复机制介导发生整合^[29].动物实验也表明:rAAV 基因组的随机整合可能会引起插入突变,导致小鼠发生肝细胞癌^[30].

对培养细胞和小鼠组织中发生 rAAV 整合的基因序列进行分析,发现 rAAV 的整合不会以利落的剪裁和粘贴方式发生,总是伴随着不同程度的序列缺失^[31-34],甚至会导致染色体易位.这些研究表明:NHEJ 机制介导了 rAAV 整合的发生.DNA-PKcs 对于 rAAV 整合具有明显的影响,但不同的研究却报告了截然相反的结果.在体外无细胞 rAAV 整合系统,加入 DNA-PKcs 蛋白抑制 rAAV 的整合,加入 DNA-PKcs 抗体则促进 rAAV 的整合^[35];在 DNA-PKcs 缺陷的 SCID 小鼠,rAAV 的整合频率显著高于正常小鼠^[35],提示 DNA-PKcs 抑制 rAAV 整合.但当使用高表达 DNA-PKcs 的 M059K 细胞及 DNA-PKcs 缺陷的 M059J 细胞进行研究时,发现 DNA-PKcs 蛋白可以促进 rAAV 的整合^[14,36].也有可能是其他因子(如 ATM),共同参与了 rAAV 的整合过程^[13-14],每种因子的作用大小取决于细胞和 rAAV 类型.总之,在 DNA 修复机制如何介导 rAAV 整合方面,尚未有明晰的结论.

2 DNA 损伤修复与 rAAV 基因表达

rAAV 载体转导非分裂细胞的效率远远优于分裂细胞.随着细胞分裂的进程,以染色体外附加体形式存在的 rAAV 基因组会逐渐在子代细胞中稀释,而失去基因表达活性.而在非分裂细胞中,rAAV 基因组可以稳定存在,并维持长期表达活性^[19],所以提高 rAAV 载体转导非分裂细胞的效率,成为实现长期、高效表达转基因的关键.

Alexander 等^[5]最早发现,以紫外光照射等方式对非分裂细胞进行 DNA 损伤处理,可提高 rAAV 载体的转导效率达 750 倍.随后 Russell 等^[6]报道,用阿非迪霉素或羟基脲等 DNA 合成抑制剂预处理正常人成纤维细胞,rAAV 载体转导效率可提高 300 倍以上.拓扑异构酶抑制剂依托泊苷或喜树碱也有同样的效果.近期研究表明,羟基脲等药物可以干扰细胞 DNA 损伤应答元件的功能^[37].核仁素(nucleolin,NCL)和核基质蛋白(nucleophosmin,NPM)是参与 DNA 损伤反应的因子,具有结合单链 DNA 和 RNA 的能力^[38-39].羟基脲可能是通过减弱这些因子结合 rAAV 基因组的能力,从而提高 rAAV 载体的转导效率^[37].这些结果表明:合成具有激活细胞 DNA 损伤修复能力的药物,是提高 rAAV 载体人体内基因表达效率的可行手段.目前可以应用的药物有顺铂、羟基脲、喜树碱和鬼臼乙叉甙等^[9].

3 DNA 损伤修复与 rAAV 基因打靶

基因打靶是指通过 DNA 定点同源重组,改变基因组中特定基因功能的方法,是矫正致病基因的有效方法.普通基因治疗载体介导的基因打靶效率,一般低于细胞总数的百万分之一,而 rAAV 的效率却高达 1%^[40-43].如果通过位点特异性内切核酸酶,在靶基因位点引入 DSB,更可以将重组效率进一步增加 60~100 倍以上^[44-45].

有关 rAAV 介导的基因打靶分子机制研究刚刚起步.起初认为 rAAV 载体的单链性质是进行高效基因打靶的关键^[46].最近发现,基因组为双链的 rscAAV 介导基因打靶的效率,与单链 rAAV 不相上下^[47].rAAV 载体的基因打靶主要发生在 S 期细胞,在已分化的细胞则效率很低^[48-49],说明 rAAV 基因打靶应用的 DNA 修复途径,与基因组整合不同.总的来说,NHEJ 似乎是 rAAV 整合的主要途径,而 rAAV 基因打靶则使用 HRR 途径^[50].

Rahman 等^[51]发现, rAAV 基因打靶效率也可以通过合用小分子药物而提高. 靛玉红-3'-脞是一种治疗白血病的有效药物, 属于细胞周期激酶(CDK)抑制剂. 肿瘤细胞经靛玉红-3'-脞处理后, 细胞周期停滞发生在细胞周期的 G1 或 G2 期, 此时以 rAAV 基因打靶, 效率可以提高 6 倍.

4 结束语

尽管 rAAV 基因药物的临床应用已经获得认可, 大量临床研究也正在顺利进行中, 但人们对 rAAV 在宿主细胞内的行为还知之甚少. 从病毒学、分子生物学等角度, 认真研究 rAAV 载体的基本生物学性质, 尤其是其胞内命运的分子机制, 一定会有利于其临床应用潜力的挖掘. DNA 损伤修复对 rAAV 载体的胞内命运, 是非常有意义的研究方向, 相关成果的取得也一定会为 rAAV 转基因表达和基因打靶效率的优化奠定扎实的理论基础.

参考文献:

- [1] MILLER N. Glybera and the future of gene therapy in the European Union[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(5): 419.
- [2] MINGOZZI F, MEULENBERG J J, HUI D J, et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells[J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2077-2086.
- [3] MANNO C S, PIERCE G F, ARRUDA V R, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response[J]. *Nat Med*, 2006, 12(3): 342-347.
- [4] 刁勇, 许瑞安. 重组腺相关病毒载体诱导的天然免疫反应及机制[J]. *微生物学报*, 2012(5): 550-557.
- [5] ALEXANDER I E, RUSSELL D W, MILLER A D. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of non-dividing cells by adeno-associated virus vectors[J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8282-8287.
- [6] RUSSELL D W, ALEXANDER I E, MILLER A D. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5719-5723.
- [7] DEYLE D R, RUSSELL D W. Adeno-associated virus vector integration[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(4): 442-447.
- [8] SCHULTZ B R, CHAMDERLAIN J S. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1189-1199.
- [9] CERVELLI T, PALACIOS J A, ZENTILIN L, et al. Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(3): 349-357.
- [10] SCHWARTZ R A, PALACIOS J A, CASSELL G D, et al. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex limits adeno-associated virus transduction and replication[J]. *J Virol*, 2007, 81(23): 12936-12945.
- [11] 张德莉, 朱圣姬, 罗光富, 等. 自由基与 DNA 氧化损伤的研究进展[J]. *三峡大学学报: 自然科学版*, 2004, 26(6): 563-567.
- [12] WILLIAMS G J, LEES-MILLER S P, TAINER J A. Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(12): 1299-1306.
- [13] SANLIOGLU S, BENSON P, ENGELHARDT J F. Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation[J]. *Virology*, 2000, 268(1): 68-78.
- [14] CATALDI M P, MCCARTY D M. Differential effects of DNA double-strand break repair pathways on single-strand and self-complementary adeno-associated virus vector genomes[J]. *J Virol*, 2010, 84(17): 8673-8682.
- [15] QING K, HANSEN J, WEIGEL-KELLEY K A, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Role of cellular FKBP52 protein in transgene expression[J]. *J Virol*, 2001, 75(19): 8968-8976.
- [16] QING Ke-yun, LI Wei-ming, ZHONG Li, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: Role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines in vitro and transgenic mice in vivo[J]. *J Virol*, 2003, 77(4): 2741-2746.
- [17] NASH K, CHEN W, MCDONALD W F, et al. Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication[J]. *J Virol*, 2007, 81(11): 5777-5787.
- [18] TORRES-RAMOS C A, PRAKASH S, PRAKASH L. Requirement of yeast DNA polymerase delta in post-replicative repair of UV-damaged DNA[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(41): 25445-25448.

- [19] PENAUD-BUDLOO M, LE GUINER C, NOWROUZI A, et al. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle[J]. *J Virol*, 2008, 82(16): 7875-7885.
- [20] CHOI V W, MCCARTY D M, SAMULSKI R J. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing[J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10346-10356.
- [21] INAGAKI K, MA C, STORM T A, et al. The role of DNA-PKcs and artemis in opening viral DNA hairpin termini in various tissues in mice[J]. *J Virol*, 2007, 81(20): 11304-11321.
- [22] MA Y, SCHWARZ K, LIEBER M R. The Artemis: DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2005, 4(7): 845-851.
- [23] DUAN Dong-sheng, YUE Yong-ping, ENGELHARDT J F. Consequences of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit deficiency on recombinant adeno-associated virus genome circularization and heterodimerization in muscle tissue[J]. *J Virol*, 2003, 77(8): 4751-4759.
- [24] DUAN Dong-sheng, YAN Zi-ying, YUE Yong-ping, et al. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates[J]. *Virology*, 1999, 261(1): 8-14.
- [25] YAN Zi-ying, LEI-BUTTERS D C, ZHANG Yu-long, et al. Hybrid adeno-associated virus bearing nonhomologous inverted terminal repeats enhances dual-vector reconstruction of minigenes in vivo[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(1): 81-87.
- [26] BERNSTEIN K A, GANGLOFF S, ROTHSTEIN R. The RecQ DNA helicases in DNA repair[J]. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 393-417.
- [27] KOTIN R M, SINISCALCO M, SAMULSKI R J, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(6): 2211-2215.
- [28] INAGAKI K, PIAO C, KOTCHEY N M, et al. Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver[J]. *J Virol*, 2008, 82(19): 9513-9524.
- [29] MILLER D G, PETEK L M, RUSSELL D W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 767-773.
- [30] DONSANTE A, MILLER D G, LI Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma[J]. *Science*, 2007, 317(5837): 477.
- [31] INAGAKI K, LEWIS S M, WU X, et al. DNA palindromes with a modest arm length of greater, similar 20 base pairs are a significant target for recombinant adeno-associated virus vector integration in the liver, muscles, and heart in mice[J]. *J Virol*, 2007, 81(20): 11290-11303.
- [32] MILLER D G, TROBRIDGE G D, PETEK L M, et al. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells[J]. *J Virol*, 2005, 79(17): 11434-11442.
- [33] NAKAI H, FUESS S, STORM T A, et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice[J]. *J Virol*, 2005, 79(1): 214-224.
- [34] NAKAI H, WU X, FUESS S, et al. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver[J]. *J Virol*, 2005, 79(6): 3606-3614.
- [35] SONG Si-hong, LU Yuan-qing, CHOI Y K, et al. DNA-dependent PK inhibits adeno-associated virus DNA integration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7): 2112-2116.
- [36] DAYA S, CORTEZ N, BERNS K I. Adeno-associated virus site-specific integration is mediated by proteins of the nonhomologous end-joining pathway[J]. *J Virol*, 2009, 83(22): 11655-11664.
- [37] JOHNSON J S, SAMULSKI R J. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus[J]. *J Virol*, 2009, 83(6): 2632-2644.
- [38] YANG Chong-lin, MAIGUEL D A, CARRIER F. Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): 2251-2260.
- [39] TAKAGI M, ABSALON M J, MCLURE K G, et al. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin[J]. *Cell*, 2005, 123(1): 49-63.
- [40] HENDRIE P C, RUSSELL D W. Gene targeting with viral vectors[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(1): 9-17.
- [41] KHAN I F, HIRATA R K, RUSSELL D W. AAV-mediated gene targeting methods for human cells[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(4): 482-501.
- [42] RUSSELL D W, HIRATA R K. Human gene targeting by viral vectors[J]. *Nat Genet*, 1998, 18(4): 325-330.

[43] VASILEVA A, JESSBERGER R. Precise hit: Adeno-associated virus in gene targeting[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(11): 837-847.

[44] MILLER D G, PETEK L M, RUSSELL D W. Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(10): 3550-3557.

[45] PORTEUS M H, CATHOMEN T, WEITZMAN M D, et al. Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double-strand breaks[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(10): 3558-3565.

[46] HIRATA R K, RUSSELL D W. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors[J]. J Virol, 2000, 74(10): 4612-4620.

[47] HIRSCH M L, GREEN L, PORTEUS M H, et al. Self-complementary AAV mediates gene targeting and enhances endonuclease delivery for double-strand break repair[J]. Gene Ther, 2010, 17(9): 1175-1180.

[48] LIU Xiao-ming, YAN Zi-ying, LUO Mei-hui, et al. Targeted correction of single-base-pair mutations with adeno-associated virus vectors under nonselective conditions[J]. J Virol, 2004, 78(8): 4165-4175.

[49] TROBRIDGE G, HIRATA R K, RUSSELL D W. Gene targeting by adeno-associated virus vectors is cell-cycle dependent[J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(4): 522-526.

[50] FATTAH F J, LICHTER N F, FATTAH K R, et al. Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(25): 8703-8708.

[51] RAHMAN S H, BOBIS-WOZOWICZ S, CHATTERJEE D, et al. The nontoxic cell cycle modulator indirubin augments transduction of adeno-associated viral vectors and zinc-finger nuclease-mediated gene targeting[J]. Hum Gene Ther, 2013, 24(1): 67-77.

Interplay between DNA-Damage Response and Recombinant
Adeno-Associated Virus Vector in Host Cells

PENG Jun-chun, DIAO Yong, LI Zhao-fa,
WANG Qi-zhao, LYU Ying-hui

(School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The article mainly discusses the connection between the mechanism of DNA repair in cells and the recombinant AAV (rAAV) vectors, and explores the methods for improving the efficiency of rAAV vectors expression and gene targeting by regulating the mechanism of DNA repair in host cells, thus more likely to increase the rAAV vectors gene expression.

Keywords: adeno-associated virus; gene therapy; DNA damage repair; gene targeting

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)