

·综述·

DNA 双链断裂修复途径中重要的修复蛋白

王芹 刘晓秋 刘强 李进 樊飞跃

【摘要】 DNA 双链断裂修复是 DNA 损伤最主要的修复途径之一, 修复基因可以修复 DNA 损伤, 保持遗传信息的完整性, 从而抑制肿瘤的发生。目前已知参与 DNA 双链断裂损伤修复的机制有两种——非同源性末端连接和同源重组修复机制。该文介绍了参与非同源末端连接和同源重组修复机制的几种重要的修复蛋白。

【关键词】 DNA 损伤; DNA, 重组; DNA 修复; 非同源末端连接; 同源重组

Important DNA repair proteins in DNA double-strand break repair pathways WANG Qin, LIU Xiao-qiu, LIU Qiang, LI Jin, FAN Fei-yue. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: FAN Fei-yue, Email: faithfan@yahoo.com

【Abstract】 DNA double-strand break repair pathway is one of DNA damage repair pathways. DNA repair genes can repair DNA damage, maintain the integrity of the genetic information and inhibit the formation of tumors. There are two mechanisms—non-homologous end joining and homologous recombination to repair DNA double-strand break. In this review, an overview of important repair proteins of non-homologous end joining and homologous recombination pathways was introduced.

【Key words】 DNA damage; DNA, recombinant; DNA repair; Non-homologous end joining; Homologous recombination

DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)是双螺旋 DNA 分子的两条链在相对位置或相邻数个碱基处同时发生断裂的现象, 是发生在基因组水平上最严重的 DNA 损伤形式之一。体内的修复系统会积极参与消除或修复损伤的 DNA, 以使遗传物质恢复到原有的状态; 如果受损的 DNA 未得到及时、有效的修复或发生错误修复, 则可能导致遗传突变和肿瘤发生。因此, 正确的 DSBs 修复在维持生物体遗传稳定性方面发挥了重要的作用。

目前已知有两种机制参与 DSBs 的修复, 一种是非同源性末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复机制, 此机制主要通过 DNA 连接酶的作用将断裂的 DNA 双链重新连接起来; 另一种是同源重组 (homologous recombination, HR) 修复机制,

此机制主要是利用 DNA 序列间的同源性来识别 DSBs, 而负责配对和重组的蛋白质因子并无序列特异性。NHEJ 和 HR 这两种 DSBs 修复机制都是由多个修复蛋白参与, 经过多步反应的复杂过程, 共同维护细胞基因组的稳定性。

1 DSBs 的修复机制

1.1 NHEJ 的作用机制

NHEJ 通过 DNA 连接酶的直接作用将断裂的 DNA 双链重新连接起来, 是哺乳动物细胞 DSBs 的重要修复方式^[1]。NHEJ 不需要完整的同源序列, 重组形成的 DNA 的两条链的同源性较差^[2]。它直接连接 DNA 断端, 没有复杂的修复过程, 修复 DSBs 快速但不准确。最简单的 NHEJ 是连接互补的断端, 最初的序列可以恢复。NHEJ 也能连接非互补的断端, 这种修复方式有发生突变的可能。但对具有庞大基因组的哺乳动物细胞来说, 发生错误的位置可能并不在编码 DNA 的序列上, 细胞存活更为重要。NHEJ 因没有任何修饰, 难免会有少量 DNA 插入或缺失, 对于非同源或不配对的序列来说, 并

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.01.010

基金项目: 国家自然科学基金(30870583); 中国医学科学院放射医学研究所学科发展基金(所发 0822)

作者单位: 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 樊飞跃 (Email: faithfan@yahoo.com)

不影响其修复的完成。

1.2 HR 的作用机制

HR 的主要特性是同源序列互补配对, 重组常常只发生在两个 DNA 分子中的相同部位, 发生交换的 DNA 的两个区域的核苷酸序列必须是相同或很相似。在细菌、噬菌体和酵母中, HR 是非常精确的 DSBs 的修复方式。

HR 的同源序列来源于姐妹染色单体、同源染色体或 DNA 重复序列, 通常情况下 HR 通过产生两个完整的拷贝而准确修复^[9]。HR 的作用机制包括 3 个过程: ①DNA 损伤位点的加工处理; ②链侵入和修复合成; ③Holliday 中间体的形成与解离。HR 过程中需要很多蛋白的参与, 包括 Rad51、Rad52、Rad54、遗传性乳腺癌和卵巢癌易感基因 1 (hereditary breast and ovarian cancer susceptibility gene, BRCA1)、BRCA2、Rad51 同系物(Rad51b、Rad51c 和 Rad51d)、X 射线修复交叉互补基因 2 (X ray repair cross complementing gene 2, XRCC2)、XRCC3 和 MRN 复合体 (由 Mre11、Nbs1 和 Rad50 3 个蛋白质组成的基因修复复合体)等。除了上述直接参与 HR 的蛋白, 还有大量参与启动损伤反应和细胞周期调控的分子, 也参与 DNA 的修复过程, 如毛细血管扩张性共济失调突变基因 (ataxia telangiectasia mutated, ATM)、毛细血管扩张性共济失调突变和 Rad3 相关基因(ATM and Rad3-related, ATR)和 DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)。

2 参与 NHEJ 修复的蛋白质

2.1 DNA-PK

DNA-Pk 是一种核内丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 属于磷脂酰肌醇-3 蛋白激酶家族, 是参与 NHEJ 修复的最重要的功能蛋白。DNA-PK 由 3 个亚基组成, 分别为一个 DNA-PK 催化亚基 (DNA-PK catalytic subunit, DNA-PKcs)和两个 DNA 结合亚基, 即 Ku70/Ku80 异二聚体^[4]。

2.1.1 DNA-PKcs

DNA-PKcs 是 NHEJ 中最重要的蛋白因子, 能使多种核内调节蛋白 (如 P53、视网膜母细胞瘤蛋白等)磷酸化, 对转录、复制、重组和 DNA 的修复起调节作用^[9]。DNA-PKcs 能够直接与 DSBs 损伤处的单链 DNA 区域结合, 激活自身的丝氨酸 / 苏氨酸酶活性, 可发生自身磷酸化, 从而影响整个复合

物分子的构象变化, 使得末端加工酶和连接酶可以接近双链 DNA 断裂末端, 完成 NHEJ 修复。DNA-PKcs 自身磷酸化是该蛋白定位于 DNA 损伤位点和双链断裂重接所必需的。

2.1.2 Ku70/Ku80

Ku 蛋白的名称来源于一自身免疫病患者姓氏的起始字母, 能被多种自身免疫病患者的血清识别, 广泛存在于哺乳动物细胞核内。Ku 蛋白由 Ku70/Ku80 异二聚体组成, 是 DNA-PK 的组分, 主要功能是参与 NHEJ 修复机制修复 DSBs^[6]。Ku 蛋白能非特异性地结合于 DNA 断裂处, 招募 DNA-PKcs 分子与 DNA 结合, Ku 与 DSBs 的结合并不需要其他蛋白质因子, 在 NHEJ 中, 它能最早感应并结合到 DSBs 末端, 并为后续蛋白的结合与组装提供支架^[7]。此外, Ku 蛋白在维持端粒结构稳定性、免疫球蛋白 V (D)J 重排和调控特定基因转录等过程中起着重要作用。

XRCC5 基因产物是 Ku80 蛋白, xrs-5、xrs-6 和 XR-V15B 均为 XRCC5 基因缺陷细胞系。有研究表明, xrs-5 和 xrs-6 突变株由于缺乏编码 Ku80 的 XRCC5 基因, DSBs 的修复能力缺失, 因此对射线敏感; 而当把 Ku80 cDNA 转染到 xrs-5 和 xrs-6 细胞株后, xrs-5 细胞原来缺乏的对免疫球蛋白 V(D)J 重组修复的能力得到纠正, xrs-6 细胞对辐射的耐受性明显增强^[8]。

2.2 XRCC4

XRCC4 蛋白是一种核磷酸蛋白, 该蛋白中心区与连接酶 IV 作用形成复合物, 在 NHEJ 中被 DNA-PK 募集, 参与 DSBs 修复^[9]。XRCC4 基因缺陷的小鼠胚胎细胞由于 DSBs 不正确的修复而导致胚胎死亡, 同时缺陷细胞系具有对辐射敏感、染色体不稳定性 and 免疫球蛋白 V(D)J 重组受损等表型。若把该基因转染到缺乏 DSBs 修复能力且对辐射敏感的 XR-1 突变细胞中, 能使此细胞获得 DSBs 修复功能并改变其辐射敏感性。

2.3 XRCC7

XRCC7 基因是负责 DSBs 修复的基因, 其编码产物为 P350 蛋白, 是 DNA-PK 的组成部分, 在 NHEJ 中起着重要作用^[10]。敏感细胞株如 V3、scid、irs20、SX9、XR-C1 以及 XR-C2 等因 DNA 链修复缺陷而表现出对电离辐射的敏感性增高, 诱发染色体不稳定性。XRCC7 基因缺陷细胞系表现为双链

断裂重接和免疫球蛋白 V(D)J 重组缺陷。当把该基因转染到有 DSBs 修复缺陷的辐射敏感突变细胞中后,其 DSBs 的重接速率和水平显著增加,对辐射的耐受性也明显提高。

3 参与 HR 修复的蛋白质

3.1 Rad51

小鼠 Rad51 蛋白是在哺乳动物细胞中发现的第一个 HR 相关蛋白,随后又发现了人的 Rad51 蛋白(HsRad51)。HsRad51 与酵母 Rad51 的同源性高达 83%,与大肠杆菌 RecA 蛋白的同源性达 55%。HsRad51 能在其 N 末端形成与酵母 Rad51 和 RecA 蛋白相同的表面环状或丝状的构型,用以结合 DNA 分子。在人类细胞 DSBs 的 HR 修复中, Rad51 基因家族[包括 Rad51 和 5 个 Rad51 同系物(XRCC2、XRCC3、Rad51b、Rad51c 和 Rad51d)]所介导的 HR 修复有利于维持基因组的稳定性,抵抗各种细胞毒性因子对 DNA 的损害^[1]。Rad51 蛋白表达水平的失调则可促进肿瘤的发生和发展,并影响肿瘤的治疗效果和患者的生存率^[12]。

Rad51 是催化断裂的 DNA 双链与完整的同源 DNA 姐妹链进行链间转移置换的关键酶,当 DNA 出现双链断裂时, Rad51 蛋白的表达增高,并在 Rad52 的引导下,与 DNA 受损部位结合,形成聚合于 DNA 3' 端的 Rad51 核蛋白丝。Rad51 核蛋白丝是一个松散的螺旋结构,催化寻找同源靶点序列,使受损的 DNA 链进入同源姐妹染色体的同源序列中,在损伤链的断裂部位,完整的同源 DNA 单链可形成一个 D 环与损伤链交叉,以利于 DNA 损伤部位的重新合成,最后两条单链之间的霍利迪连接在 Rad51c-XRCC3 或 Rad51c 的作用下解旋。

3.2 XRCC2

XRCC2 是 HR 修复蛋白 RecA/Rad51 家族中一个关键的组成成分,其功能是把 Rad51 招募到断裂的 DNA 末端^[13]。XRCC2 与 Rad51b、Rad51c、Rad51d 结合形成的复合物与单链 DNA 和双链 DNA 连接,促使 Rad51 识别 DNA 的双链断裂位点和促进 Rad51-DNA 细丝的装配,在 HR 修复的早期阶段发挥重要作用^[14]。

XRCC2 表达失调可降低 HR 修复的准确性,破坏与其他重组修复途径及 DNA 损伤检查点之间的平衡,引起基因组的不稳定,进而促进肿瘤的发

生和发展。XRCC2 基因的表达缺失可引起核心蛋白 Rad 51 产生缺陷,导致 DNA 损伤得不到有效修复,从而增加自发的染色体畸变和染色体异常分离的风险。研究发现,与母代细胞株相比, XRCC2 基因缺失的仓鼠细胞可导致 DSBs 引发的 HR 修复功能降低 100 多倍。但当用表达 XRCC2 的质粒转染后,其修复能力则提升至接近野生水平^[15]。

3.3 XRCC3

XRCC3 基因是哺乳动物中重要的 DNA 修复基因,在参与 DSBs 的修复过程中起重要作用。在 DNA 损伤的修复过程中, XRCC3 与 DNA 聚合酶 III 结合参与以 Rad51 为中心的重组复合体的形成^[16], XRCC3 对此复合体的形成和稳定发挥作用。哺乳动物的 XRCC3 基因编码类似于酵母中 Rad51 样蛋白,在维持基因组稳定性上起着非常重要的作用。XRCC3 基因缺陷细胞系 irs1SF 对多种 DNA 损伤剂呈现敏感的表型,具有自发的遗传不稳定性,表现为染色体畸变率升高。当用表达 XRCC3 的载体转染 irs1SF 细胞后,可以将其对辐射和 DNA 交联剂的耐受性提高到野生型水平,细胞核内能够重新形成 Rad51 的核心点。

3.4 BRCA1

BRCA1 是用定位克隆技术成功克隆出的第一个与家族性乳腺癌和卵巢癌相关的基因。BRCA1 蛋白是带有保守氨基酸末端环指结构域和羧基末端转录激活域的核内磷酸化蛋白,通过与细胞中的功能调节蛋白相互结合,参与细胞周期、基因和蛋白稳定、中心体复制、DNA 损伤修复、核转录活性和细胞凋亡等众多生物学功能^[17]。

BRCA1 蛋白自身和(或)与其他 DNA 修复蛋白的相互作用参与 DNA 的损伤修复,或通过调控其他修复因子的表达水平介导 DNA 的损伤修复。当 DNA 发生损伤后,首先由 DNA 损伤传感器进行探测并发出损伤信号,通过 ATM-ATR-检测蛋白 2 传导,在 BRCA1 的招募下,多个修复蛋白形成复合体,共同定位到损伤部位并进行修复。其中比较重要的 BRCA1 蛋白复合体分别是 BRCA1-BRCA2-Rad51-范可尼氏贫血互补组 D2 蛋白四聚体、BRCA1-Rad50-Mre11-NSB1(NSB1 为同源重组修复蛋白类)四聚体、BRCA1-MSH2-MSH6(MSH 为 DNA 错配修复蛋白类)三聚体和 BRCA1-Bloom 综合征蛋白通路。

DNA 损伤后, BRCA1、BRCA2 和 Rad51 同时聚集到 DNA 损伤部位进行修复。如果缺少 BRCA1, 则 BRCA2 和 Rad51 就不能形成聚集进行 DNA 损伤修复。在 BRCA1 基因表达缺失的细胞中, 射线诱导 DNA 损伤后, BRCA1-Rad50-Mre11-NSB1 也同样不能发生聚集。

4 展望

生物体 DSBs 修复是当前生命科学研究领域的热点。通过对 DSBs 修复通路机制的阐明, 新的 DNA 损伤修复蛋白不断被发现, 丰富了人们对于 DNA 修复机制及功能的认识。深入研究 DNA 修复蛋白如何在人类最常见的肿瘤疾病中发挥作用, 有助于进一步了解基因突变导致肿瘤发生发展的过程, 给肿瘤的治疗提供更多新靶点和新方法。

参 考 文 献

- [1] Demuth I, Digweed M. T The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene*, 2007, 26(56): 7792-7798.
- [2] Yano K, Morotomi-Yano K, Adachi N, et al. Molecular mechanism of protein assembly on DNA double-strand breaks in the non-homologous end-joining pathway. *J Radiat Res*, 2009, 50(2): 97-108.
- [3] Liu Y, Tarsounas M, O'regan P, et al. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1973-1979.
- [4] 杨青山, 樊飞跃. Ku 蛋白与 DNA 修复. *国际放射医学核医学杂志*, 2008, 32(1): 40-43.
- [5] 程晋. DNA 损伤修复及细胞周期检点激活的研究进展. *国际放射医学核医学杂志*, 2009, 33(6): 360-364.
- [6] Roberts SA, Ramsden DA. Loading of the nonhomologous end joining factor, Ku, on protein-occluded DNA ends. *J Biol Chem*, 2007,

282(14): 10605-10613.

- [7] Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, et al. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XR-CC4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18597-18602.
- [8] Evans JW, Liu XF, Kirchgessner CU, et al. Induction and repair of chromosome aberrations in scid cells measured by premature chromosome condensation. *Radiat Res*, 1996, 145(1): 39-46.
- [9] 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): 410-416.
- [10] Nasiri M, Saadat I, Omidvari S, et al. Genetic variation in DNA repair gene XRCC7 (G6721T) and susceptibility to breast cancer. *Gene*, 2012, 505(1): 195-197.
- [11] Shammass MA, Shmookler Reis RJ, Koley H, et al. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood*, 2009, 113(10): 2290-2297.
- [12] Kuznetsov SG, Haines DC, Martin BK, et al. Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 863-872.
- [13] 王芹. X 射线修复交叉互补基因功能的研究进展. *国外医学放射医学核医学分册*, 2005, 29(3): 132-136.
- [14] Tambini CE, Spink KG, Ross CJ, et al. The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(5): 517-525.
- [15] Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature*, 1999, 401(6751): 397-399.
- [16] 张占春. 电离辐射损伤与 DNA 修复基因. *国外医学放射医学核医学分册*, 2004, 28(1): 26-29.
- [17] Fan S, Meng Q, Auburn K, et al. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 2006, 94(3): 407-426.

(收稿日期: 2012-06-03)

(上接第 15 页)

- [6] Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, et al. Vascular architecture and microenvironmental parameters in human squamous cell carcinoma xenografts: effects of carbogen and nicotinamide. *Radiother Oncol*, 1999, 50(2): 173-184.
- [7] Bussink J, Kaanders JH, Van der Kogel AJ, et al. Clinical outcome and tumour microenvironmental effects of accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide. *Acta Oncol*, 1999, 38(7): 875-882.
- [8] Nishioka A, Ohizumi Y, Lam GK. The effects of nicotinamide plus

carbogen or pions for microscopic SCCVII tumors. *Oncol Rep*, 1999, 6(3): 583-586.

- [9] Kaanders JH, Bussink J, Van der Kogel AT, et al. ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol*, 2002, 3(12): 728-737.
- [10] Kaanders JH, Pop LA. Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide (ARCON) for laryngeal cancer. *Radiother Oncol*, 1998, 48(2): 115-122.

(收稿日期: 2012-09-11)