

文章编号: 1001-098X(2004)01-0026-04

· 放射医学 ·

电离辐射损伤与 DNA 修复基因

张占春

摘要 DNA 辐射损伤直接影响复制、转录和蛋白质合成, 进而影响细胞遗传、发育、生长和代谢等生命活动。DNA 损伤还是突变的重要原因, 而严重的突变可造成细胞癌变, 导致肿瘤的发生。然而, 生物体内存在着 DNA 损伤修复系统, 其中 DNA 修复基因起着重要的作用。

关键词 辐射损伤; DNA 修复基因; 突变细胞株

中图分类号 Q345+.7 文献标识码 A

Damage of ionizing radiation and DNA repair gene

ZHANG Zhan-chun

(Radiotherapy Department of Ningbo Medical Center, Lihuili Hospital, Ningbo 315040, China)

Abstract DNA damage after exposure to ionizing radiation has a direct effect on DNA replication, transcription and protein synthesis. Further, heredity, development and metabolism of the cells can be affected. DNA damage was an importance factor for mutation of cells, furthermore, carcinogen can be caused by severe mutation. However, there is a DNA repair system in the organism, and especially DNA repair gene plays an important role for DNA damage. This review will briefly present DNA repair gene and its function.

Key words radiation damage; DNA repair gene; radiation-sensitive

DNA 辐射损伤是细胞突变的重要原因, 而严重的突变可造成细胞癌变, 导致肿瘤的发生。然而, 生物体内存在着 DNA 损伤修复系统, 其中 DNA 修复基因起着重要的作用。

DNA 修复基因的克隆、定位及功能研究得益于模式生物, 尤其是对酵母的研究。DNA 修复缺陷的细胞一般都有对致损伤因素(如: 辐射、化学诱变剂)敏感的特征, 这种表型特征对于分离和研究细胞突变株提供了极大的便利。对辐射敏感的酵母细胞突变株称为 rad 突变株。研究表明, 酿酒酵母细胞基因组中有近 30 个遗传位点与辐射抗性有关。根据这些位点单突变和双突变的敏感特征可分为三个上位显相组(epistasis groups)^[1]: (1)rad3 组: 主要与核苷酸切除修复有关; (2)rad6 组: 被认为与复制后修复(post replication repair)或易错修复有关; (3)rad52 组: 主要参与 DSB(DNA 双链断裂)及 DNA 重组过程中的修复。DNA 修复基因在进化上具有高度的保守性, 对酿酒酵母修复基因的研究

将有助于人类修复基因的克隆、定位、及其功能的了解。上述三组修复基因在 DNA 损伤修复过程中发挥着重要作用。

1 rad3 上位显相组与 DNA 损伤修复

rad3 组修复基因产物主要参与核苷酸的切除修复(nucleotide excision repair, NER), NER 是保持基因组 DNA 结构完整性的主要修复途径之一^[2]。在辐射所诱发的 DNA 损伤和不同的致突变剂及断裂剂所诱发的 CPDS(环丁烷二聚体)和双螺旋结构的损伤修复过程中, NER 是必需的。NER 是复杂的多步骤过程, 目前确定至少有 20 种不同的蛋白质参与^[3], 此外, rad3 组中的一些成分还具有检点(checkpoint)的功能^[4]。

在酵母中目前大约有 11 个基因参与 NER, 它们是 rad1~4、rad10、rad7、rad23、rad14、rad16、mms19 和 rad24。rad1~4 和 rad10 基因突变的细胞表现为对紫外线的高度敏感, 细胞不能对紫外线诱导的 CPDS 及光诱导的 DNA 交联进行切除修复; rad3、rad7、rad14 和 rad16 突变株则表现为切除修复部分缺陷和对紫外线中度敏感。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770238)

作者单位: 315040, 宁波市医疗中心李惠利医院肿瘤放疗科

人类切除修复基因的研究得益于对人类遗传性疾病的了解,例如,着色性干皮病(xeroderma pigmentosum, XP)和 Cockayne 综合征(cockayne syndrome, CS)。XP 和 CS 患者都对紫外线极其敏感。XP 患者互补修复缺陷分别属于 7 个不同的 XP 基因互补组(XPA~XPG),其表现为在 DNA 损伤识别及核苷酸切除阶段存在着缺陷。而与 XP 相比,CS (互补组 A 和 B)在修复过程中不存在上述缺陷。应用 ^3H -胸腺嘧啶掺入法测定特定基因组序列的修复,可以将哺乳类细胞的 DNA 切除损伤修复分成三个不同的水平^[5]: (1)无活性基因的缓慢而无效的修复; (2)具有转录活性基因的有效修复(基因特异性修复); (3)活性基因转录链的快速修复,其与转录活性密切相关,故又称转录偶联修复(transcription coupled repair, TCR)。TCR 与细胞对紫外线的耐受和 DNA 损伤后转录水平的恢复有关。实验研究表明,CS 细胞对紫外线的极度敏感是由于 TCR 通路的缺陷所致^[6]。在野生型细胞株中,转录活性基因和非转录活性基因的修复率存在着差异,而在 CS 细胞中未观察到此种现象,这表明 CS 患者细胞不能直接对活性基因进行修复。

目前从 XP 患者细胞系中分离克隆了 ERCC(切除修复交叉互补基因),核苷酸序列分析表明,它们与酿酒酵母相应的 NER 基因具有高度的同源性。

2 rad6 上位显相组与 DNA 损伤修复

在酿酒酵母的三个主要修复途径中,目前对 rad6 的了解最少,但它却是一个非常重要的修复途径,因其不仅可以使细胞对 DNA 损伤因素产生耐受,而且在损伤诱导的突变中也发挥作用。由于关键基因的突变是肿瘤发生的一个重要阶段,因此阐明 rad6 的修复机制具有重要意义。

rad6 上位显相组突变细胞株不同于其他上位显相组(rad3 和 rad52),该组突变株具有多种表型,这表明 rad6 修复途径具有多个环节,且都受 rad6 组基因及其表达产物的调节和控制。研究表明,rad6 突变株尽管有时对一些特殊诱变剂的敏感性较切除或重组修复组突变株低,但大多数突变株对紫外线、X 射线及化学诱变剂均极为敏感。这显示,rad6 修复途径主要在 DNA 损伤剂的耐受方面起重要作用。rad6 缺失突变还可导致细胞存活力及生长较野生型低下、缓慢。rad6 突变不仅可

由电离辐射及化学诱变剂诱导,也可以自发地产生。研究表明,rad6 修复机制参与 DNA 复制后(post-replication)修复及 DNA 链断裂和致突变的修复。rad6 修复途径由两个不同过程组成,其一为易错修复(error-prone recovery),这主要与 DNA 损伤诱导突变产生有关,其次对 DNA 损伤耐受方面亦起一定的作用;其二为无错修复(error-free recovery),其对细胞存活具有重要意义,且在 DNA 损伤耐受方面发挥着重要作用。

rad6 的两条修复通路同时平行地存在于真核细胞中,正常情况下,无错的复制后损伤修复(post replication recovery, PRR)通路占主导地位,而当无错 PRR 通路缺陷时,细胞则进入易错诱变修复通路,表现为自发突变率及诱发突变率增加。

酿酒酵母易错诱变通路由下列基因组成: rev1、rev3、rev6、rev7、cdc8 和 ngm2。目前认为 mms3 和 srs2 也属于此组,它们在 DNA 损伤剂诱导突变方面发挥着重要作用。rev3 为非必需性 POL ξ (DNA 聚合酶 ξ)的催化亚基,rev7 与 rev3 紧密结合形成 POL ξ 。POL ξ 的跨损伤合成依赖于 rev1。rev1 具有 dCMP 转移酶活性,在 DNA 模板依赖性反应中能将 dCMP 从 dCTP 转移到 DNA 引物的 3' 端,对应于模板链无碱基位置 C 残基的插入能被 POL ξ 有效延伸,因此 rev1 转移酶活性通过在新链上对应于模板链无碱基位置插入 dCMP 来启动 POL ξ 的跨损伤合成。POL ξ 的跨损伤合成能拯救细胞免遭因复制受阻而被杀伤,但代价是导致诱变。人体内亦存在着 rev3 同源基因 hrev3,定位于 1p32-33,这表明哺乳类细胞也存在着易错的诱变修复通路^[7]。

关于无错的 PRR 修复通路,目前知之甚少。酿酒酵母中认为有下列基因组成: rad6、rad18、rad9、rad15、mms2、pcnA、POL ξ 及 rad30。rad6 基因编码一个有 172 个氨基酸残基的蛋白质,其相对分子质量为 19.7ku,该蛋白质是一种高度保守的泛素缀合酶 E2 (ubiquitin-conjugating E2 enzymes, UBC E2)^[8]。Rad6 蛋白是多功能蛋白,而每种功能都与其自身的泛素缀合活性有关。Rad6 介导的 DNA 修复必须与 Rad18 相结合,形成 Rad6-Rad18 异源二聚体。Rad18 含有一个环指基序(ring finger motif)和一个核苷酸结合基序,这两个基序都具有与 DNA 结合的能力。Rad18 还具备单链 DNA 依赖

的 ATP 酶活性, 在酿酒酵母中, Rad6-Rad18 复合物集泛素缀合活性、单链 DNA 结合能力及单链 DNA 依赖的 ATP 酶活性于一身, 其中, Rad18 的单链结合能力可使 Rad6-Rad18 复合体识别在 DNA 损伤处因复制元件停顿而形成单链 DNA, 并指导复合体与单链 DNA 相结合。Rad18 的 ATP 酶活性充当分子匹配器(matchmaker), 用于识别底物蛋白(为 DNA 复制元件的成分), 后者由 Rad6 进行泛素化。目前, 研究者正在寻找复制元件中被 Rad6-Rad18 复合体泛素化的确切成分, 并试图弄清 DNA 复制后修复元件的组装是否需要一些复制性蛋白质的泛素依赖性降解^[10]。

综上所述, rad6 依赖的修复活性是由靶蛋白的泛素化调控, 确定这些蛋白质及它们修饰的后果对 rad6 修复机制的阐明是必要的。DNA 反式激活作用, 包括修复及修复进程, 通常由多种蛋白复合物来调控, 这些成分的泛素化由其各成分的组合来实现; 另一方面, 各成分的解离在 rad6 介导的修复途径中同样起着重要作用。总之, 两个各自独立的修复通路, 共同受 rad6 上位显相组的调节。

3 rad52 上位显相组与 DNA 损伤修复

酿酒酵母 rad52 上位显相组基因产物在 DNA 的 DSB 修复及遗传重组过程中发挥着重要作用, 这些蛋白质及其作用方式已经得到确定。哺乳类 rad52 上位显相组同源性高度保守的存在, 表明酵母中 DSB 修复蛋白的功能和机制可以推论到哺乳类 DNA 的重组修复。

DSB 修复需要 DNA 重组, 介导 DSB 修复的蛋白质也参与无损伤的正常细胞进程中所发生的 DNA 重组事件。因此, DSB 修复缺陷不仅造成对 DNA 损伤剂的敏感, 而且影响酵母和哺乳类细胞的多个环节, 如: 减数分裂和有丝分裂的重组, 接合型转换(mating-type switching)及抗原受体基因的重排^[10]对酵母和哺乳类重组 DNA 修复的比较为我们阐明了确保基因结构和功能完整性的机制, 而哺乳类基因组不稳定性与肿瘤易感性、免疫缺陷和发育异常有着密切的关系。因此, 对 DNA 重组及 DSB 修复的研究具有重要的临床意义。

在酵母中, 辐射诱导的 DSB 修复通常是由损伤位点与姐妹染色体相对应位点同源重组完成, 实际上修复过程中存在着同源重组的情况, 但非常少

见。在酿酒酵母中, 辐射诱导的 DNA 损伤敏感性与重组缺陷的一致性反映了 DSB 修复的重组机制。酵母中 DNA 重组修复主要依赖于 rad52 上位显相组, 其中包括: rad50~57、RAD59、MRE11 和 XRS2 等 11 种蛋白质。目前, 5 个哺乳类 rad52 上位显相组的同源组份得到分离, 其中保守性最高的是 rad51 和 rad54, 但 mre11、rad52 和 rad50 同源基因的主要序列中也存在保守的位点区域^[11]。

rad52 上位显相组主要序列的保守性表明, 由 rad52 上位显相组蛋白介导的功能也具有保守性。酿酒酵母 rad52 组内蛋白质的相互作用在相应的人类同源染色体中也可以观察到, 这为上述观点提供了证据。

DNA 同源重组与非同源重组均由 rad52 上位显相组调控, 对辐射的敏感性是酿酒酵母 rad52 组突变株的共同特征。但是, 对其 DNA 重组表型的进一步分析发现, 其功能存在着异质性(heterogeneity)。由减数分裂特异的 DSB 所致的减数分裂重组中, Mre11、Rad52 和 Xrs2 是必需的。减数分裂特异的 DSB 在 rad51、rad52、rad55 和 rad57 突变株中形成, 这些突变株减数分裂重组功能严重受损^[12]。rad52 上位显相组突变株在有丝分裂表型方面也不尽相同。rad51 和 rad52 突变株使接合型转换丧失。DSB 的产生导致 DNA 同源重组, 在 xrs2、rad50 和 mre11 突变株中这一修复过程是必需的。DNA 损伤的同源重组修复由 Rad51、Rad52、Rad55 和 Rad57 来完成。同源重组修复缺陷导致细胞株对电离辐射和其他 DSB 诱导剂极其敏感^[13]。

尽管酿酒酵母 mre11、rad5 和 xrs(X-ray raman scattering) 突变株对 DSB 诱导剂的杀伤作用敏感, 但它们亦在接合型转换和同源重组修复时的 DSB 中大量出现。事实上, 由于这些突变, 自发性同源重组发生的频率增加^[14]。它们的非同源重组修复功能缺陷(非合法途径修复)导致细胞株对电离辐射敏感。酿酒酵母 mre11、rad50 和 rad52 突变株, 通过非同源重组途径的 DSB 修复能力较野生型酿酒酵母大大降低, 而这一过程不受 RAD51、RAD52、RAD54 或 RAD57 突变的影响。基于以上观点, 酿酒酵母的 Mre11/Rad50/Xrs2 蛋白质复合体所介导的功能与哺乳类 DSB 优势修复途径的作用相似, 这种优势修复途径在 DSB 的非同源重组修复中是普

遍存在的。

总之, 酿酒酵母中有两种 DSB 修复途径, 其机制各异, 但都由 RAD52 上位显相组蛋白质所调控。酿酒酵母 DSB 的主要修复途径是同源重组修复, 这个过程依赖于以 RAD52、RAD57 为代表的 RAD52 上位显相组蛋白。DSB 的非同源重组修复是由 Mrell/Rad50/Xrs2 蛋白质复合物介导。同源和非同源重组的 DNA 修复途径, 也共同存在于哺乳类细胞中。与酿酒酵母相比, 非同源重组修复途径是哺乳类细胞 DNA 修复的主要机制^[15]。应用辐射敏感突变株, 已将在 DSB 非同源重组起特定作用的四种哺乳类基因(pku80、pku70、xrcc4 和 DNA-PKcs)分离和纯化。这些基因及其相关蛋白质产物特征性的描述已经为哺乳类细胞的 DSB 修复的分子基础研究提供了重要依据。

参 考 文 献

- [1] Dong Z, Fasullo M. Multiple recombination pathways for sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae*: role of RAD1 and the RAD52 epistasis group genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(10): 2576-2585.
- [2] Cleaver JE, Karplus K, Kashani-Sabet M, et al. Nucleotide excision repair "a legacy of creativity"[J]. *Mutat Res*, 2001, 485(1): 23-36.
- [3] Prakash S, Prakash L. Nucleotide excision repair in yeast[J]. *Mutat Res*, 2000, 451(1-2): 13-24.
- [4] Toh GW, Lowndes NF. Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage[J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(Pt 1): 242-246.
- [5] Guzder SN, Sung P, Prakash L, et al. Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(15): 8903-8910.
- [6] Al-Moghrabi NM, Al-Sharif IS, Aboussekhra A. UV-in-

duced de novo protein synthesis enhances nucleotide excision repair efficiency in a transcription-dependent manner in *S. cerevisiae*[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2003, 2(11): 1185-1197.

- [7] Xiao W, Chow BL, Broomfield S, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways [J]. *Genetics*, 2000, 155(4): 1633-1641.
- [8] Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
- [9] Bailly V, Prakash S, Prakash L. Domains required for dimerization of yeast Rad6 ubiquitin-conjugating enzyme and Rad18 DNA binding protein[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(8): 4536-4543.
- [10] Symington LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(4): 630-670.
- [11] West SC. Molecular views of recombination proteins and their control[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 435-445.
- [12] Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells[J]. *Mutat Res*, 2003, 532(1-2): 103-115.
- [13] De la Torre C, Pincheira J, Lopez-Saez JF. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks[J]. *Histol Histopathol*, 2003, 18(1): 225-243.
- [14] Schiestl RH, Zhu J, Petes TD. Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(7): 4493-4500.
- [15] Roth DB. Restraining the V(D)J recombinase[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(8): 656-666.

(收稿日期: 2003-11-27)