

细胞DNA损伤检控点

江瑞胜, 欧阳高亮, 鲍仕登*

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 细胞生物研究室, 厦门 361005)

摘要: 细胞周期检控点是维持细胞基因组稳定性的一个重要机制, 主要包括DNA损伤检控点、DNA复制检控点和纺锤体组装检控点。其中DNA损伤检控点能检测细胞在生命活动过程中出现的DNA损伤并引发细胞周期阻滞, 为修复损伤提供足够的时间, 以保证细胞遗传的稳定性。有关DNA损伤检控点的研究近年来已经取得了突破性进展, 现简要介绍近年来在DNA损伤检控点研究中的一些新进展。

关键词: 细胞周期; 检控点; DNA损伤; ATM/ATR

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-209-07

在细胞的生命活动过程中, 一些细胞代谢产物和环境因素(如紫外线等)都可能影响细胞基因组的完整性, 同时基因组复制过程中也会产生一些DNA损伤。如果这些损伤无法被检测到并加以修复, 细胞就可能发生癌变或者死亡。细胞在长期进化过程中发展了一套能够检测DNA损伤、维护细胞遗传稳定性和完整性的机制, 这个机制被称为DNA损伤检控点(DNA damage checkpoint)。DNA损伤检控点能够检测受损或者结构异常的DNA, 并启动检控点信号转导途径。检控点信号转导路径的激活可引发一系列下游生物学事件, 如细胞周期阻滞和对受损DNA的有效修复。与其他的信号转导途径类似, DNA损伤检控点信号转导途径也包括感受器(如ATM、ATR等)、转导因子(如Chk1、Chk2等)和效应器(如Cdc25A、Cdc25C、p21等)。感受器负责检测DNA的结构异常并启动检控点信号, 转导因子进一步将信号转导给相应的效应器, 效应器则引发这个路径上的生物学效应。

在对酵母的研究中人们发现了一些在DNA损伤检控点起重要作用的关键因子, 这些因子在生物进化过程中相对保守, 目前已经在多种真核生物中都找到了这些检控点蛋白的类似物(见表1)。关于DNA损伤如何启动检控点信号转导、调控细胞周期运行等方面的研究已经取得了很大进展, 并且已经建立了一个关于DNA损伤检控点调控的大概框架。但是对于损伤检测和信号转导的具体细节还不是很清楚。在人类细胞中, 检控点功能缺陷所引起的遗

表1 不同真核生物细胞中DNA损伤检控点蛋白类似物^[1]

蛋白激酶类别	芽殖酵母 (<i>S.cerevisiae</i>)	裂殖酵母 (<i>S.pombe</i>)	人类 (human)
PI3K类激酶	Mec1、Lcd1 Tel1	Rad3、Rad26 Tel1	ATR、ATRIP ATM
9-1-1复合物	Ddc1 Rad17 Mec3	Rad9 Rad1 Hus1	Rad9 Rad1 Hus1
类RFC复合物	Rad24	Rad17	Rad17
信号转导激酶	Chk1 Rad53	Chk1 Cds1	Chk1 Chk2

传不稳定性(genomic instability)与细胞癌变密切相关, 一些检控点蛋白的突变可明显增加人体患癌症的几率。因此深入研究DNA损伤检控点将有助于揭示细胞癌变的分子机制, 并可为寻找有效的癌症治疗方法提供坚实的理论基础。

1 DNA损伤的检测

在哺乳动物细胞中, PI3K激酶家族的两种蛋白(ATM和ATR)以及另外四种基因产物(Rad9、Rad1、Hus1和Rad17)参与了DNA损伤检控点应答早期的损伤检测并启动检控点信号转导。

1.1 ATM和ATR

ATM最初是从AT(毛细血管扩张性共济失调综合症)病人中克隆出来的突变基因。ATM功能缺陷

收稿日期: 2003-09-08; 修回日期: 2003-11-24

国家自然科学基金(No.30170463、30370307)和福建省青年科技人才创新项目资金(No.2003J017)资助

*通讯作者, E-mail: sdbao26@yahoo.com

会导致细胞出现检控点功能缺陷, 这些缺陷包括 G₁ 期 DNA 损伤检控点引发的周期阻滞功能的丧失、抗辐射性 DNA 合成(radioresistant DNA synthesis, RDS) 以及损伤细胞提前进入 M 期(有丝分裂期), 而且在经 IR(离子辐射)或者类放射性药物处理的细胞中的 ATM 迅速活化^[2], 这些表明 ATM 在 DNA 损伤检控点的活化中起着重要的作用。另外, 生化研究显示 ATM 能直接与 DNA 双链断裂(DSB)的末端结合, 并且当细胞内出现 DNA DSB 之后, 染色质结构的变化可诱导 ATM 的 Ser1981 位点发生快速的自体磷酸化^[3], 说明 ATM 作用于 DNA 损伤检测的早期。目前已知活化的 ATM 能够磷酸化多个下游蛋白, 包括 Chk2、BRCA1、NBS1、p53 等, 但是 ATM 识别、结合损伤位点并激活下游蛋白的具体机制并没有完全弄清楚。

ATR 是作用于 DNA 损伤检控点早期的另外一种重要蛋白。ATR 具有比 ATM 更广的损伤应答范围, ATM 几乎专一地作用于 DNA DSB 的应答, 而 ATR 对于 UV 和 IR 诱导的损伤都可产生应答。早期在对酵母的研究中发现 ATR 通常和另一种辅助蛋白形成复合物起作用。在裂殖酵母中, 细胞内发生各种 DNA 损伤之后, Rad26 是 Rad3 结合损伤位点和活化所需要的, 同时 Rad26 还会发生 Rad3 依赖性的磷酸化^[4]。在对芽殖酵母的研究中也发现 Lcd1 对于 Mec1 结合损伤位点以及启动检控点信号非常关键。当细胞缺乏 Mec1 的时候, Lcd1 可以结合到损伤位点。但如果没有 Lcd1, Mec1 将无法结合到损伤位点, 并且无法对损伤做出应答^[5]。后来对人类细胞的研究中也发现了 ATRIP(ATR-interacting protein)能够与 ATR 相互作用形成复合物, 是 DNA 损伤检控点应答途径中的一个重要成分^[6]。由于 ATR 和 DNA-PK 是同族蛋白, 而 DNA-PK 需要 Ku 蛋白才能有效地识别 DNA 末端。因此, ATRIP 等很可能就是 ATR 的 Ku 蛋白类似物, 它们能直接结合到 DNA 损伤位点再通过与 ATR 之间的某种作用方式而诱发 ATR 结合损伤位点, 激活 ATR 的激酶活性, 启动检控点信号传导。另外近来人们还发现, 在人类细胞中 ATR-ATRIP 复合物结合损伤位点、活化下游激酶需要 RPA(复制蛋白 A)的参与, 在对芽殖酵母的研究中也得到类似的结果^[7]。因此 ATR 识别损伤的机制还有很多细节值得研究。

目前并没有发现 ATR 与损伤位点结合之后发生了活性的变化, 而且体外人工诱导损伤之后也无法

检测到细胞内 ATR 的活性增强。但用免疫荧光方法发现损伤会诱导 ATR 发生细胞内定位的变化, 即从弥散分布变成聚集分布, 而 ATM 并没有进入损伤诱导的核聚体(nuclear foci)内^[8]。这样看来, 与 ATM 不同, ATR 很可能是通过位置变化而对 DNA 损伤产生应答, 移入核聚体内以使 ATR 更接近其作用底物。

1.2 9-1-1 复合物和类 RFC 复合物

Rad9、Rad1、Hus1 和 Rad17 这 4 种蛋白也是损伤检测和检控点信号启动的关键因子, 这些蛋白的突变都会导致细胞出现 DNA 损伤检控点功能缺陷。Rad9、Rad1 和 Hus1 可形成一个类似 PCNA(增殖细胞核抗原)的复合物, 称为 9-1-1 复合物。Rad17 可替代 RFC140 亚基并和 RFC36、37、38、40 形成一个类似 RFC(复制因子 C)的复合物。在 DNA 复制期间, RFC 复合物能帮助 PCNA 结合到 DNA 上并形成一个环状的滑动夹。而 9-1-1 复合物和类 RFC 复合物在 DNA 损伤检控点中也是以类似的方式起作用的, 当细胞内出现 DNA 损伤之后, Rad17 能够协助 9-1-1 复合物结合到损伤位点^[9,10]。不过, 尽管 Rad17 会发生 ATM/ATR 介导的磷酸化, 但是因为 Rad17 在细胞内出现 DNA 损伤之前就与染色体结合, 而且 Rad17 的磷酸化需要 Hus1, 因此 Rad17 的磷酸化并不是 9-1-1 复合物结合损伤位点所需的, 9-1-1 复合物结合损伤的机制与 ATM/ATR 识别损伤的机制完全不同, 是损伤检测早期的两个独立事件^[10]。

除 Rad17 可发生损伤诱导的 ATM/ATR 依赖性磷酸化, Rad9 也是损伤细胞内 ATM 磷酸化作用的靶蛋白, 并且 Rad17 和 Rad9 的磷酸化位点突变会导致细胞检控点功能缺陷。同时, 9-1-1 复合物和 RFC 复合物是 Rad53 等下游效应因子的活化所需的, 但却与 Rad26、Lcd1 等 Mec1 的辅助因子的活化无关^[11]。因此, 9-1-1 复合物和 RFC 复合物很可能起着转接因子(adaptor)的作用, 可以协助 Rad53 等下游效应因子结合到损伤位点以便 Mec1 对它们进行有效的磷酸化。

细胞内外的多种因素可造成各种各样的 DNA 损伤。在 DNA 损伤修复机制中, 这些损伤会被不同的修复蛋白所识别、修复。那么 DNA 损伤检控点是否具有独立的损伤检测成分, 能否独立识别损伤? 目前大多数的观点认为, 损伤检控点的检测因子并不是相对独立的, 而是与修复机制密切相关。损伤检控点的检测因子可能通过两种方式来实现其

生物学功能: 一种方式是通过与DNA修复蛋白之间的相互作用而结合到损伤位点, 并且在修复因子结合到损伤位点的时候被活化; 另外一种方式是DNA损伤检控点的检测因子能够识别DNA修复过程中普遍产生的某种中间物质(或者结构)^[12]。最近检测的超级复合物BASC(BRCA1-associated genome surveillance complex)含有很多检控点蛋白和修复蛋白, 如: BRCA1、ATM、MRN复合物(Mre11-Rad50-NBS1)、MLH1、MSH2等。研究BASC复合物成分在检控点调控中的作用将有助于深入揭示损伤检测和损伤信号传导的具体机制^[13]。

2 DNA损伤检控点的信号转导激酶

ATM和ATR活化之后可以磷酸化下游信号转导蛋白以传递检控点信号。目前的研究已经发现, Chk1和Chk2这两种信号转导激酶分别接受ATR和ATM传导的检控点信号。这两种激酶都有大量的SQ/TQ(SerGln/ThrGln)特征序列, 这些序列是ATM/ATR的磷酸化位点。ATR、ATM能够分别激活Chk1和Chk2的激酶活性, 后者通过调控下游效应因子而引发细胞周期阻滞。野生型ATR过表达可提高Chk1的磷酸化程度, 说明Chk1的首要上游调节因子是ATR, 而Chk2的主要上游调控因子则是ATM^[14]。Chk1和Chk2在检控点信号转导过程中并没有明确的分工, 许多研究表明在细胞周期内的不同阶段, 对不同性质的损伤产生应答时, Chk1和Chk2的功能上有很多协同、重复和互补。

Chk1的损伤应答范围较广, IR可以诱导Chk1的Ser345位点发生适度的磷酸化, UV可以诱导Chk1发生Ser345高度磷酸化。该位点的磷酸化大大增强了Chk1对下游靶分子Cdc25C、p53的激酶活性。Ala替换Ser317和345的Chk1突变体对于遗传损伤只能产生微弱的活化。另外新近发现BRCA1也是Chk1的一个重要的活化因子, 因为BRCA1突变的细胞系中Chk1的激酶活性和G2/M细胞周期阻滞都受到一定程度的削弱。但是具体的分子机制还不是很清楚^[15]。近来发现的一种新蛋白claspin对于损伤检控点应答过程中Chk1的活化也非常重要, 不过具体的机制还没有完全研究清楚^[16]。

损伤诱导的Chk2磷酸化活化是一个比较特殊的过程。Chk2的N末端具FHA结构域, 能与磷酸化的Thr残基结合, 起着蛋白间相互作用模块的作用。这个FHA结构域对Chk2的磷酸化活化非常重

要, FHA结构域内的氨基酸点突变会削弱细胞的检控点调控功能^[17]。IR首先诱导Chk2的Thr68位点发生ATM依赖性磷酸化, 磷酸化的Thr68能和其他Chk2分子中的FHA域结合, 形成Chk2寡聚体。寡聚体内的Chk2随后会发生Thr383、387位点的自磷酸化, 完全激活Chk2, 活化的Chk2中FHA域与Thr68的亲和力降低, 彼此分离, 从而形成活化的Chk2单体^[18]。Chk2能够磷酸化p53/MDM2、Cdc25A和Cdc25C, 从而引发G₁、S、G₂检控点的活化^[19]。

BRCA1在ATM/ATR-Chk1/Chk2的信号传导过程中具有非常重要的作用。首先, 在体外ATM/ATR都能磷酸化BRCA1的多个位点, BRCA1缺陷会导致细胞出现各种检控点功能缺陷^[20]。ATM至少能磷酸化BRCA1的5个位点, 这5个位点中的3个(1387、1423和1524)是正常细胞中IR诱导BRCA1磷酸化的主要位点, 其中1423和1524双位点Ala替代Ser可导致细胞检控点功能出现缺陷。ATR也可磷酸化BRCA1的6个Ser/Thr残基, 这些磷酸化位点有部分和ATM的作用位点相重复^[21,22]。其次, BRCA1与Chk1/Chk2有着非常密切的相互作用。BRCA1是Chk1的一个重要的活化因子, 同时Chk2又能磷酸化BRCA1的Ser988, 该位点的磷酸化促进了Chk2和BRCA1的分离^[23]。考虑到BRCA1磷酸化的复杂性以及该抑癌基因在检控点信号转导、BASC复合物聚集、蛋白泛素化降解、同源重组过程中的多向性, BRCA1的具体功能尚需进一步深入研究。

近来还发现其他一些蛋白在损伤信号的转导中有着重要的作用。比如MDC1(mediator of DNA damage checkpoint protein 1)在DNA损伤出现之后是ATM的作用底物, 并且是MRN复合物结合损伤位点、p53活化所需的^[24]。另外一种蛋白53BP1(p53结合蛋白1)在细胞内出现损伤之后能结合到损伤位点, 同时也是ATM/ATR的磷酸化底物。而且53BP1是p53聚集、IR诱导的G₂、S期检控点活化所必需的^[25]。这些蛋白以及claspin、BRCA1可能在损伤检控点的活化中起着中间介质(mediator)的作用, 能够介导信号转导因子结合到损伤位点, 以便上游的损伤检测因子对它们进行有效的活化。这些中间介质以及BASC复合物的存在同时也显示了检控点信号传导机制的复杂性。很可能在不同的细胞周期时相、针对不同类型的DNA损伤, 都有不同的中间

介质在起作用,因此,完全弄清楚DNA损伤检控点的信号转导机制还需要很多研究工作。

3 细胞周期内各个时期的DNA损伤检控点调控

DNA损伤检控点一般根据细胞周期时相而分为3个:(1) G_1 期DNA损伤检控点:在进入下一个有丝分裂细胞周期之前将带有损伤的细胞阻滞在限制点(restriction point);(2)S期DNA损伤检控点:当细胞内出现损伤时能够使DNA合成速度减慢或停止;(3) G_2 期DNA损伤检控点:阻止带有损伤的细胞进入M期(有丝分裂期)。

3.1 G_1 期DNA损伤检控点

G_1 期DNA损伤检控点的主要特征是p53磷酸化蛋白的聚集。早期的研究发现IR和UV处理之后细胞会发生p53聚集,而p53缺失的突变细胞中却不会出现DNA损伤诱导的 G_1 细胞周期阻滞,说明p53在 G_1 期检控点中起着非常重要的作用。DNA损伤除了导致p53水平提高之外,还会通过转录后调节方式激活p53的转录活化功能,促进CDK的抑制因子p21(WAF1/CIP1)的表达,p21的表达抑制了与CyclinE、CyclinA相结合的CDK的活性,并由此阻止细胞由 G_1 期进入S期^[26]。

ATM是主要的p53调节激酶,ATM所启动的检控点信号通过间接或直接的方式提高p53的稳定性和活性。辐射激活的ATM直接磷酸化p53的N末端的Ser15,同时ATM还会磷酸化MDM2的Ser395以阻止其对p53的降解作用,正常细胞中MDM2与p53的结合会导致p53的泛素化降解和核输出。同时,ATM激活的Chk2还会磷酸化p53的Ser20位点,该磷酸化将进一步避免MDM2对其的降解。辐射激活的ATR激酶也能磷酸化p53的Ser15,不过相对于ATM,ATR在IR诱导的p53磷酸化中起较为次要的作用。UV处理AT细胞后,p53的磷酸化并没有发生变化,但在过量表达功能显性失活的ATR突变体的成纤维细胞中,p53的Ser15位点磷酸化大大降低^[27]。表明ATR在UV诱导的DNA损伤检控点应答中是主要的p53调节激酶,ATR会直接或者间接地通过Chk1磷酸化p53的Ser15位点,引发 G_1 期检控点。

3.2 S期DNA损伤检控点

细胞在S期进行基因组的复制,尽管DNA复制机制有着很高的精确率,但是由于DNA复制的量

非常大,所以在复制过程中产生错误是无法避免的。如果这些损伤无法在S期内被修复,那么很可能会传递给子代细胞,成为可遗传的突变。因此,S期DNA损伤检控点的生物学功能就是检测细胞内存在的DNA损伤并阻断DNA复制的继续进行。目前已经发现一些参与S期DNA损伤检控点的检控点途径,包括ATM-Chk2-Cdc25A、ATM-NBS1-SMC1和ATR-Chk1-Cdc25A。

ATM是IR诱导损伤之后S期DNA损伤检控点活化所需的。正常细胞在经过IR处理之后DNA合成速度会迅速降低或者停止,而损伤的AT细胞却表现出RDS。如果用能够去除ATM激酶活性的药物处理正常细胞,细胞内也会出现RDS。这也说明ATM在辐射诱导的S期DNA损伤检控点中也起作用^[28]。ATM是通过激活下游激酶Chk2来调控S期DNA损伤检控点。在IR处理S期细胞之后,Chk2磷酸化Cdc25A的Ser123位点而诱发其发生泛素化降解,而Cdc25A是激活CyclinA-CDK2复合物的主要调节因子,这个复合物的活化对S期的DNA复制起始非常关键。这样,S期DNA损伤检控点就可以有效地抑制CDK2发生Tyr15位点的去磷酸化活化,从而阻断DNA复制的进行。因此,Cdc25A是IR诱导的ATM-Chk2检控点途径的直接靶蛋白^[29]。

另外,NBS1蛋白也参与了S期DNA损伤检控点的调控。NBS1和Mre11、Rad50一起形成的MRN复合物在DSB修复中有重要功能,而且NBS1突变的NBS细胞具有很多和AT细胞相似的特征,包括RDS。IR处理之后ATM可直接磷酸化NBS1的三个位点:Ser343、397、615,这3个位点中的任何一个发生突变都会导致S期细胞损伤检控点功能的缺失^[30]。这说明ATM-NBS1途径也在S期检控点中起作用。磷酸化的NBS1和ATM共同作用磷酸化另外一种蛋白SMC1(structure maintenance of chromosome)的Ser957和Ser966两个位点,Ala替代这两个位点的SMC1突变体高表达会导致细胞失去S期检控点^[31]。这些说明SMC1是ATM/NBS1依赖性S期检控点的一个下游效应蛋白,在DNA损伤所诱导的S期检控点应答方面同样起着非常重要的作用。

由于NBS细胞也会发生Chk2的活化和Cdc25A的降解。因此,Chk2/Cdc25A分支和NBS1/SMC1分支可能同时在细胞内起作用。Chk2/Cdc25A分支调节细胞周期机制,而NBS1/SMC1分支更可能调节DNA复制机制。这样,当细胞内出现DNA损伤

时, S 期检控点可同时调整细胞周期和 DNA 复制。

另外, 功能显性失活的 ATR 可导致 RDS, 表明 ATR-Chk1 也是 S 期检控点的上游激酶。ATR-Chk1-Cdc25A 途径可能参与调控 UV 诱导损伤激活的 S 期检控点。

目前已知的这些 S 期 DNA 损伤检控点调控途径之间并没有存在重复, ATM、ATR、NBS1、Chk2 和其他因子的缺失都会影响 S 期损伤检控点, 这说明这些因子之间互相依赖。这很可能说明 S 期损伤检控点的完全活化需要上述的所有机制都正常起作用, 或者换句话说, 某个机制在 S 期损伤检控点的起始中比较重要, 而其他机制在维持 S 期阻滞中比较重要。今后的研究工作将进一步揭示哺乳动物细胞内 S 期 DNA 损伤检控点的调控机制。

3.3 G_2 期 DNA 损伤检控点

G_2 期 DNA 损伤检控点的功能是阻止带有 DNA 损伤的细胞进入有丝分裂期的最后一道关卡。有丝分裂的目的是将两份染色体拷贝正确无误地分给两个子代细胞, G_2 期 DNA 损伤检控点的作用就是将带有损伤的细胞阻滞在 M 期之前, 为损伤修复提供足够的时间, 使得传递给子代细胞的 DNA 损伤数量最小化, 以保证子代细胞得到正确的基因组拷贝。

Cdc25C 是连接 G_2 期 DNA 损伤检控点信号传导途径和细胞周期调控途径的关键因子。哺乳动物细胞从 G_2 期进入有丝分裂期依赖于 Cdc25C 的磷酸酶活性, 这种磷酸酶活性可介导 Cdc2 的 Tyr14 和 Tyr15 位点去磷酸化, 而 Cdc2 的去磷酸化可活化 CyclinB/Cdc2 复合物, 后者的活化则导致细胞从 G_2 期进入有丝分裂期^[32,33]。

在对酵母的研究中人们发现了 G_2 期 DNA 损伤检控点调控中的一个作用机制, 这个机制在脊椎动物中也相对保守。整个调控机制大致可以这样表述: DNA 损伤诱导 ATR 激活 Chk1, 活化的 Chk1 可磷酸化 Cdc25C 的 Ser216 位点, 该位点的磷酸化导致 14-3-3 σ 与 Cdc25C 发生抑制性结合和 Cdc25C 的核输出, 这样 Cdc25C 就无法活化 CyclinB/Cdc2 复合物, 从而引起 G_2 /M 周期阻滞^[34,35]。ATR-Chk1-Cdc25C 这个 G_2 期 DNA 检控点调控途径也得到了其他实验的证实。在 ATR 基因敲除的人类体细胞模型中, IR 照射会导致细胞错误地进入有丝分裂期^[6]。

ATM-Chk2 同样也在 G_2 期 DNA 损伤检控点中起作用, Chk2 能够在体外磷酸化 Cdc25C 的 Ser216 位点。因此 ATM-Chk2-Cdc25C 是一条与 ATR-Chk1-

Cdc25C 平行的调控途径^[33]。但需要指出的是, 在 AT 细胞中, G_2 期出现的 DNA 损伤无法诱导细胞发生周期阻滞, 而 G_2 期之前出现的 DNA 损伤却能够激活 G_2 期细胞周期检控点, 引起 G_2 /M 细胞周期阻滞^[36,37]。显然这个周期阻滞是由一个 ATR 依赖性的机制所执行的。这说明 ATM 只是 G_2 期产生的 DNA 损伤诱导的 G_2 期检控点活化所必需的。在同时表达 ATM/ATR 的细胞中, ATM-Chk2 可能起到了加强 ATR-Chk1 途径所启动的对 CyclinB/Cdc2 抑制的作用。Chk2^{-/-} 胚胎干细胞在维持损伤诱导的 G_2 /M 细胞周期阻滞方面存在缺陷, 也说明 Chk2 在维持与加强细胞周期阻滞方面有所作用^[35]。因此, ATM-Chk2 途径可能在 G_1 和 S 期产生的 DSB 所活化的 G_2 检控点中起着次要作用。不过, 如果带有损伤的细胞越过 G_1 和 S 期之后, ATM 对于 G_2 检控点活化则显得非常关键。AT 细胞的这种特异性说明 ATM 和 ATR 所启动的检控点信号转导途径有所不同, 具体的机制还有待以后的研究进一步阐明。

4 展望

总的看来, 当细胞内出现 DNA 损伤之后, 修复蛋白能够马上识别各种损伤, 然后 ATM/ATR 通过某种机制结合到损伤位点, 9-1-1 复合物在类 RFC 复合物协助下也能够结合到损伤位点, 并起着转接因子(adaptor)的作用, 协助下游转导因子结合损伤位点和 ATM/ATR 对它们的磷酸化活化。同时

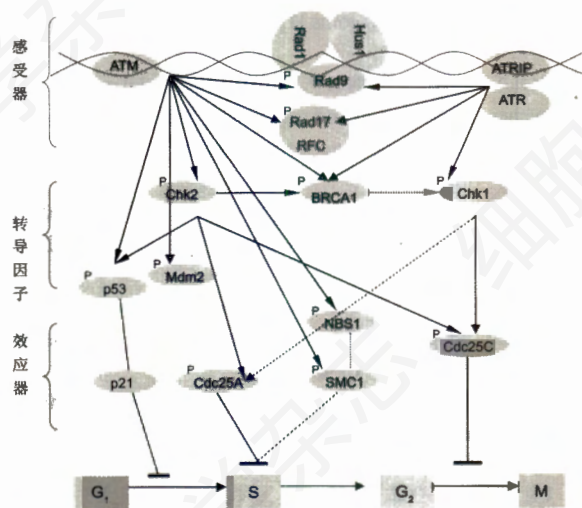


图1 人类细胞DNA损伤检控点的大致作用模式^[38]

箭头表示磷酸化活化, 平头线表示转录活化, 钝头线表示抑制作用, 虚线表示未发现或未确定的作用。

BRCA1、MDC1、53BP1等中间介质(mediator)也会被ATM/ATR活化,介导了检控点信号的有效转导。活化后的信号转导因子通过各条信号转导途径进一步将检控点信号传递给各个效应通路上的效应器,引起细胞周期阻滞(见图1)。

近些年来的一些深入研究已经建立了一个关于DNA损伤检控点的概念框架。一些较为明确的机制(如:ATM/ATR-Chk2-p53-p21和ATR-Chk1-Cdc25C)已经能够把DNA损伤的出现和细胞周期调控机制连接到一起。但是还有一些机制了解的还不是很透彻(如:ATM-NBS1-SMC1)。另外,DNA损伤检测和损伤信号转导的具体分子机制也还不是很清楚,特别是9-1-1复合物和类RFC复合物在检控点信号启动中的作用还有待深入研究。

另一个尚需探索的领域是损伤修复之后细胞如何切断检控点信号传导,重新启动细胞周期进程。该领域的研究将使我们了解对检控点的机制和基因组稳定性的分子基础有更深入的了解。

参 考 文 献

- [1] MELO J, TOCZYSKI D. A unified view of the DNA-damage checkpoint [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**: 237 — 245.
- [2] ABRAHAM R T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases [J]. *Genes Dev*, 2001, **15**: 2177 — 2196.
- [3] BAKKENIST C T, BAKKENIST C J. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation [J]. *Nature*, 2003, **421**: 499 — 506.
- [4] EDWARDS R J, BENTLEY N J, CARR A M, *et al.* A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, **1**: 393 — 398.
- [5] ROUSE J, JACKSON S P. LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EMBO J*, 2000, **19**: 5801 — 5812.
- [6] CORTEZ D, GUNTUKU S, QIN J, *et al.* ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling [J]. *Science*, 2001, **294**: 1713 — 1716.
- [7] ZOU L, ELLEDGE S J, *et al.* Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes [J]. *Science*, 2003, **300**: 1542 — 1548.
- [8] TIBBETTS R S, CORTEZ D, BRUMBAUGH K M, *et al.* Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**: 2989 — 3002.
- [9] VENCLOVAS C, THELEN M P. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 2481 — 2493.
- [10] ZOU L, CORTEZ D, ELLEDGE S J. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin [J]. *Genes Dev*, 2002, **16**: 198 — 208.
- [11] KONDO T, WAKAYAMA T, NAIKI T, *et al.* Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms [J]. *Science*, 2001, **294**: 867 — 870.
- [12] ROUSE J, JACKSON S P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage [J]. *Science*, 2002, **297**: 547 — 551.
- [13] WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**: 927 — 939.
- [14] ZHAO H, PIWNICA W H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 4129 — 4139.
- [15] YARDEN R I, PARDO R S, SGAGIAS M, *et al.* BRCA1 regulates the G₂/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage [J]. *Nat Genet*, 2002, **30**: 285 — 289.
- [16] JEONG S Y, KUMAGAI A, LEE J, *et al.* Phosphorylated claspins interact with a phosphate-binding site in the kinase domain of Chk1 during ATR-mediated activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 46782 — 46788.
- [17] LEE C H, CHUNG J H. The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 30537 — 30541.
- [18] AHN J Y, LI X, DAVIS H L, *et al.* Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 19389 — 19395.
- [19] MATSUOKA S, HUANG M, ELLEDGE S J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase [J]. *Science*, 1998, **282**: 1893 — 1897.
- [20] CHEN J. Ataxia Telangiectasia-related Protein Is Involved in the Phosphorylation of BRCA1 following Deoxyribonucleic Acid Damage [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**: 5037 — 5039.
- [21] CORTEZ D, WANG Y, QIN J, *et al.* Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks [J]. *Science*, 1999, **286**: 1162 — 1166.
- [22] XU B, KIM S T, KASTAN M B. Involvement of Brca1 in S-phase and G₂-phase checkpoints after ionizing irradiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 3445 — 3450.
- [23] LEE J S, COLLINS K M, BROWN A L, *et al.* hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response [J]. *Nature*, 2000, **404**: 201 — 204.
- [24] STEWART G S, WANG B, BIGNELL C R, *et al.* MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint [J]. *Nature*, 2003, **421**: 961 — 966.
- [25] WANG B, MATSUOKA S, CARPENTER P B, *et al.* 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint [J]. *Science*, 2002, **298**: 1435 — 1438.
- [26] MAYA R, BALASS M, KIM S T, *et al.* ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage [J]. *Genes Dev*, 2001, **15**: 1067 — 1077.
- [27] TIBBETTS R S, BRUMBAUGH K M, WILLIAMS J M,

- et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53 [J]. *Genes Dev*, 1999, **13**: 152 — 157.
- [28] SARKARIA J N, BUSBY E C, TIBBETTS R S, *et al.* Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine [J]. *Cancer Res*, 1999, **59**: 4375 — 4382.
- [29] FALCK J, MAILAND N, SYLJUASEN R G, *et al.* The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis [J]. *Nature*, 2001, **410**: 842 — 847.
- [30] GATEI M, YOUNG D, CEROSALETTI K M, *et al.* ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure [J]. *Nat Genet*, 2000, **25**: 115 — 119.
- [31] YAZDI P T, WANG Y, ZHAO S, *et al.* SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint [J]. *Genes Dev*, 2002, **16**: 571 — 582.
- [32] SANCHEZ Y, WONG C, THOMA R S, *et al.* Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25 [J]. *Science*, 1997, **277**: 1497 — 1501.
- [33] O'CONNELL M J, WALWORTH N C, CARR A M. The G₂-phase DNA-damage checkpoint [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**: 296 — 303.
- [34] GUO ZJ, KUMAGAI A, WANG S X, *et al.* Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**: 2745 — 2756.
- [35] LIU Q, GUNTUKU S, CUI X S, *et al.* Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M DNA damage checkpoint [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**: 1448 — 1459.
- [36] SCOTT D, SPREADBOROUGH A R, ROBERTS S A. Radiation-induced G₂ delay and spontaneous chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes [J]. *Int J Radiat Biol*, 1994, **66**: S157 — S163.
- [37] BEAMISH H, LAVIN M E. Int. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay [J]. *J Radiat Biol*, 1994, **65**: 175 — 184.
- [38] QIN J, LI L. Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints [J]. *Radiat Res*, 2003, **159**: 139 — 148.

Cell DNA Damage Checkpoint

JIANG Rui Sheng, OUYANG Gao Liang, BAO Shi Deng*

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Cell cycle checkpoint is a vital mechanism to maintain the genomic stability of the cell. It mainly includes DNA damage checkpoint, DNA replication checkpoint and spindle assembly checkpoint. Among these checkpoints, DNA damage checkpoint can detect the DNA damages in the cell and cause cell cycle arrest, which will guarantee proper damage repair and ensure genomic stability. Studies of DNA damage checkpoint have achieved great progress in recent years. This paper will make a brief review about these advances.

Key words: cell cycle; checkpoint; DNA damage; ATM/ATR

Granted by the National Natural Science Foundation of China (No.30170463, 30370307) and Innovation Project Foundation of Fujian Province for Young Scientists (No.2003J017)

*Corresponding author, E-mail: sdbao26@yahoo.com