

# 人 XPB 基因在核苷酸剪切修复和基因转录中的分子机制

胡晓东 张吉翔\*

(江西医学院第二附属医院, 江西省分子医学重点实验室, 南昌 330006)

**摘要** 核苷酸剪切修复(NER)途径是维持生物体基因组稳定的重要机制。人着色性干皮病B组(xeroderma pigmentosum group B, XPB)基因又名 ERCC3 基因, 它既是 NER 途径不可缺少的成员又是转录因子 TFIIH 的最大 p89 亚基。它是具有从 3' 端→5' 端依赖 ATP 的单链 DNA 解旋酶活性的蛋白质, 执行依赖 DNA 的 ATP 酶和解旋酶功能, 在损伤 DNA 修复和基因转录中均起重要作用, 并将两者有机偶联。该基因突变将导致 3 种不同的遗传疾病: 着色性干皮病(xeroderma pigmentosum, XP), 科凯恩氏综合征(cockayne's syndrome, CS), 毛发硫营养不良(trichothiodystrophy, TTD)。其基因型通过在 DNA 修复和转录中的功能与表型联系起来。另外, XPB 与 p53 存在物理和功能上的相互作用。现从 XPB 的 3 个方面即“一个基因, 两种功能, 3 种疾病”作一综述。

**关键词** XPB; 核苷酸剪切修复; TFIIH; DNA 修复; 基因转录

遗传物质 DNA, 常常暴露于有害的细胞内外环境物质中, 致使 DNA 的结构受损, 导致生死攸关的遗传信息的丢失。机体在抵制结构损伤带来的潜在的致命性的打击过程中, 为维持基因组稳定性和完整性, 产生了各种各样的细胞修复损伤 DNA 机制, 其中最重要也是探讨得最为透彻的是核苷酸剪切修复(nucleotide excision repair, NER)<sup>[1]</sup>。多种肿瘤的发生与该途径中基因功能的缺失或下降密切相关<sup>[2]</sup>, 因此探讨和研究 NER 途径中的基因功能具有重要意义。

## 1 NER 分子机制

NER 途径通过蛋白质与蛋白质及蛋白质与 DNA 的相互作用<sup>[3]</sup>, 修复多种大片段的 DNA 损伤: 如紫外线诱导的嘧啶二聚体和 6-4 光反应产物, 大分子化学加合物和交联产物等。NER 途径历经 5 个步骤涉及约 30 种蛋白质: (1)多蛋白复合物 XPC-hHR23B、RPA 等识别损伤 DNA 并改变损伤 DNA 的构象, 同时将转录因子 TFIIH、XPG 等因子募集至损伤处; (2)在损伤部位的 3' 和 5' 端分别引入 TFIIH 的解旋酶 XPB 和 XPD, 双向解开损伤 DNA, 形成 20~30 bp 的开放结构。XPA 结合至损伤链, RPA 结合至未损伤链以稳定该开放状态, XPC-hHR23B 脱落; (3)内切酶 XPG 除稳定整个开放

复合物外, 它依赖 XPB 的 C 末端结构, 在损伤 DNA 3' 端的单链与双链接合点切开损伤链, 随后 XPF-ERCC1 在 5' 端切开, 切除含损伤 DNA 在内的约 25~32 bp 核苷酸寡聚体; (4)以未损伤链为模板, 在 PCNA 等作用下合成核苷酸; (5)连接 DNA 两端缺口完成修复全过程<sup>[4,5]</sup>。NER 反应有两种模式: 一是包括非转录基因的全基因组修复(global genome NER, GG-NER), 该模式慢且低效; 二是已活化的转录基因的转录偶联修复(transcription-coupled NER, TC-NER), 该模式优先进行且高效。TC-NER 又可进一步分为: 转录延长中依赖 RNA 聚合酶的转录链优先修复和在转录起始位点附近选择性的修复<sup>[6]</sup>。

## 2 TFIIH 因子与 XPB

TFIIH 是由 9 个亚基(XPB/p89, XPD/p80, p52, p62, p44, p34, cdk7, cyclinH, MAT1)组成的蛋白质复合体, 可分为两个基团: 5 个亚基核心区(XPB, p52, p62, p44, p34)和 CAK (cdk-activating kinase)区(cdk7 cyclin H, MAT1); XPD 既可位于核心区也可位于 CAK 区, 它将 CAK 和核心区连接成整体 TFIIH。TFIIH 是唯一具有酶活性的转录因子即: XPB 的 3'

收稿日期: 2004-10-19 接受日期: 2004-12-21

国家自然科学基金资助项目(No.30360037)

\* 通讯作者。Tel: 0791-6292706, Fax: 0791-6262262, E-mail:

jxiangz@163.net

端→5'端解旋酶, XPD的5'端→3'端解旋酶, cdk7的C末端激酶<sup>[7,8]</sup>。p52亚基是XPB发挥作用所必需的分子伴侣, 它以与XPB成双的(pairwise)作用形式调控XPB功能, 类似于p44与XPD之间的关系<sup>[9]</sup>。p52通过残基1~135和残基303~381与XPB的N端结合将XPB锚定于TFIIH内; 另外, XPB的N端还可结合XPD和p34, 在其残基305~387可结合p44和p62<sup>[10]</sup>。

TFIIH在NER的两种反应模式中均发挥核心作用, 它作为基本转录因子还参与RNA聚合酶II(RNA polymerase II, RNAP II)作用下的基因转录<sup>[11]</sup>。TFIIH在基因转录和DNA修复中执行两种完全独立的功能, 并将两者有机偶联。

### 3 XPB结构与生物学特性

#### 3.1 XPB结构

人着色性干皮病B组(xeroderma pigmentosum group B, XPB)基因在1990年由Weeda等<sup>[12]</sup>克隆测序, 又名ERCC3 (excision repair cross complementing 3) 基因, 它位于人常染色体2q21位, 编码一段长782 aa的具有DNA解旋酶活性的蛋白质, 有7个连续的保守序列, 由3个功能区组成: N端的DNA及ATP结合域, 含解旋酶模体的催化核心区, 5'剪切所需的C端区<sup>[13]</sup>。

#### 3.2 XPB的生物学特性

XPB作为NER途径的重要成员和TFIIH的最大p89亚基, 是具有从3'端→5'端ATP依赖的单链DNA (single-stranded DNA, ssDNA)解旋酶活性的蛋白质, 执行依赖DNA的ATP酶和解旋酶功能。XPB负责解开双螺旋损伤DNA和RNAP II转录启动子附近DNA, 是NER修复和基因转录不可缺少的重要功能基因。

**3.2.1 XPB在转录中的作用** RNAPII转录是多步骤过程, 包括起始前复合物(preinitiation complex, PIC)形成, 启动子打开, 启动子逃逸和转录延长。启动子打开, 起始复合物的形成和启动子逃逸(PNAPII延长复合物离开启动子)均需要XPB的解旋酶活性和ATP酶水解活性, 其中最关键的是依赖XPB在转录起始位点附近局部解开DNA双链, 使转录起始复合物由关闭状态转变成开放状态<sup>[14,15]</sup>。

转录开始时, 一旦PIC形成, XPB解旋酶在转录起始位点-9/+2解开并维持11 bp处于开放状态, 此时启动子打开, 随后RNA第一个磷酸二酯键合成; 随着RNAPII延长起始的转录子, XPB逐

渐解开至17 bp(-9/+8)时突然转移到+3/+11, 这时启动子逃逸完成<sup>[16]</sup>。在此过程中RNAPII可能会中途停止和重新启动转录, 释放短的转录子。在激活的转录中XPB对启动子逃逸整个过程起调节作用, 其解旋活性增强启动子逃逸的效率, 这可能是一种转录协同机制<sup>[17]</sup>, XPB的作用环节主要是在RNAPII脱离过程中, 负责阻止早期延长复合物在成熟前停滞于启动子<sup>[18]</sup>。XPB 3'末端C-A突变影响了转录起始和启动子打开, 可能是突变削减了XPB在启动子DNA定位准确性和/或结合的稳定性, 与启动子接触后不能完全解开转录起始位点DNA序列<sup>[19]</sup>。

**3.2.2 XPB在NER中的作用** 在GG-NER和TC-NER途径的解旋过程中, XPB执行3'端→5'端DNA依赖的ATP酶和解旋酶功能, 联合XPD在损伤处解旋并维持10~20 bp DNA序列处于松弛状态, 促使开放的修复复合物的组装形成。由于XPB基因功能失活的病人易患皮肤癌, 它在功能上被认为是剪切修复基因和抑癌基因<sup>[1]</sup>。

XPB基因在3'端出现C-A框移突变, 增加41个氨基酸后, 其解旋活性明显降低, NER作用几乎完全失活, 表明该基因的3'端与DNA修复密切相关; 但是, XPB基因的3'端没有任何与DNA或RNA解旋酶有关的序列。含此突变型XPB的TFIIH与野生型TFIIH相比, 在化学计量组成、激酶活性和ATP酶活性方面均无差异, 认为XPB突变后构象发生改变, 降低了XPB的解旋活性; ATP酶活性无明显异常, 可能是亚基XPD的ATP酶活性掩盖了XPB的ATP酶活性缺失<sup>[20]</sup>。也有人证实XPB 3'端的C-A突变, 并不削弱XPB解旋功能和随后的3'端剪切, 但极大地阻碍了5'端剪切<sup>[21]</sup>, 可能XPB本身或TFIIH有助于XPD-ERCC1对损伤DNA链5'端的切除。但是, 在RNAP II转录反应中, 同样的XPB突变明显降低了其在启动子的解旋, 可能XPB突变后尚存的解旋酶活性足以解开NER中损伤处DNA, 但不足以解开转录启动子。

### 4 XPB突变与疾病

XPB突变引起NER严重缺陷, 导致3种不同的常染色体遗传病, 着色性干皮病(xeroderma pigmentosum, XP), 科凯恩氏综合征(cockayne's syndrome, CS), 毛发营养不良(trichothiodystrophy, TTD), 另外还降低细胞转录活性, 解释NER缺陷所不能解释的XP、CS和TTD临床症状<sup>[20]</sup>。XPB在转录和修复中的双重作用(转录偶联修复)使临床上出现的XP与CS合并

症状得到解释。

通过微注射 XPB 抗体入正常细胞系, NER 修复作用和 RNAPII 转录活性均受到抑制,但抑制率不同,在 NER 抑制率为 90%~95%,而在转录中则为 30%。可能对于不同的 DNA 物质,所需要的 XPB 解旋活力不同,或是突变的 XPB 活性被解旋酶 XPD 弥补, XPD 缺陷导致 NER 缺陷而对转录活性影响小<sup>[20]</sup>。欣慰的是,所有的 XPB 病人的缺陷表型均可通过转染或微注射野生型 XPB cDNA 入缺陷细胞得到修复。

## 5 XPB 与其他因子的相互作用

### 5.1 XPB 与 p53

p53 是另一种类型的 DNA 修复基因,它在 GG-NER 中既募集损伤识别因子,又参与修复复合物的组装,而且其功能是通过一个 NER 因子实现的,已证实了不是 XPC<sup>[22]</sup>,推测可能是 XPB。因为 XPB 与 p53 存在物理上和功能上的相互联系,参与 p53 依赖性的促凋亡途径<sup>[23]</sup>。p53 通过末端直接与 XPB 的模体 III 结合,调节 XPB 在 TFIIH 中的解旋活性,诱导细胞凋亡,这种凋亡途径是不依赖于 p53 的反式激活;在 XPB 基因缺陷病人的纤维母细胞,XPB 的缺陷导致 p53 介导的凋亡途径中止,但通过导入野生型 XPB,可恢复 p53 介导的凋亡反应。XPB 作为 p53 发挥功能的重要下游因子<sup>[24]</sup>,已成为癌症治疗的新靶点。也有推测,p53 是通过转录激活其下游因子 DDB2 (damaged DNA binding protein 2) / p48 识别损伤 DNA,NER 因子 XPC-hHR23B 与 DDB2 结合并在损伤处替代 DDB2,启动 NER 修复<sup>[25]</sup>。

### 5.2 XPB 与 HBx

最近研究发现,HBV 感染肝细胞后,其蛋白质 HBx 与 XPB 相互作用,抑制 NER 后诱导肝细胞癌发生<sup>[26]</sup>。在 XPB 的启动子序列有转录因子 SP1 的结合位点,HBx 与 SP1 结合后,影响了 SP1 与 XPB 的启动子的结合,降低了约 80% 的 XPB 启动子活性,XPB 基因转录和蛋白质表达受阻,此过程不依赖于 p53<sup>[27]</sup>。另外,HBx 可与 p53 的 C 末端残基 293~393 区结合,而这区域也是 p53 与 XPB 的结合部位。HBx 与 p53 结合后,一方面使 p53 功能处于静息状态,抑制了 p53 对 XPB 的作用,另一方面竞争抑制了 p53 C 末端与 XPB 结合,使 XPB 表达下降,此过程依赖于 p53<sup>[28]</sup>。所以在富含 p53 及 p53 缺失的肝细胞,HBx 均能下调内源性 XPB 表达,该

过程也不依赖 HBx 的反式激活。

先前认为致癌物诱导肝细胞突变累积和肝癌发生,是由于 HBx 与 TFIIH 直接作用影响了 NER 中 XPB 和 XPD 的解旋剪切精确性和效率,或 HBx 与 p53 相互作用影响了 p53 的转录活性及对 TFIIH 的调节作用,影响并抑制了 NER 作用效率。但是 Capovillat 等<sup>[29]</sup>发现,在 GG-NER 中,HBx 并不直接与 TFIIH 相互作用,HBx 的存在不影响 NER 途径早期对于损伤 DNA 的识别,也不影响 XPB、XPD 在损伤处的解旋乃至随后的 DNA 互补合成;而在 TC-NER 中,HBx 通过直接与 RNAP II 的亚基 rpb5 作用使 RNAP II 在转录链停止,干扰了 NER 核心成分在损伤 DNA 处的募集和作用;认为 HBx 抑制 TC-NER 而不抑制 GG-NER。这与 HBx 在环丁烷导致嘧啶二聚体的肝细胞,抑制 GG-NER 而不抑制 TC-NER 的结论相反<sup>[30]</sup>。我们认为 HBx 抑制 NER 反应出现的明显矛盾主要是由于不同损伤 DNA 在识别和修复上的差异所致。

## 6 小结

由 RNAP II 指导的 mRNA 的合成是真核生物正常生存的关键环节,它不仅需要完整的 DNA 作为模板,还需要有正常功能的转录因子 TFIIH 等。XPB 既是损伤 DNA 的修复基因又是转录因子 TFIIH 的亚基,它一方面为转录提供了完整的 DNA,另一方面作为转录因子直接参与转录。XPB 的生物学特性及其与 p53 的密切关系,使它受到生物学家越来越多的关注,成为癌症治疗新的靶点。在我们的课题研究中,选择了与肝癌发生密切相关、又处于 NER 修复和 RNAPII 转录关键位置的 XPB 基因为目标,克隆了人 XPB 基因的全长编码序列,并构建能在真核细胞表达野生型 XPB 的重组体。实验验证在表达 HBx 的 HepG2 肝癌细胞(含野生型 p53),p53 介导的 NER 受到抑制,其 NER 效力下降了 75%<sup>[31]</sup>,提示这可能是人肝细胞癌发病机制之一。我们将构建的 XPB 重组体转染入 HepG2 细胞,并检测到了由此引起的 HepG2 细胞的生物学变化和相关的重要基因(如 c-myc, p53, p21)的表达的变化。相关实验还在进一步深入。

### 参考文献 (References)

- [1] Ishikawa T et al. *Cancer Sci*, 2004, 95: 112
- [2] Friedberg EC. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1: 22

- [3] Coin F *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 1357  
[4] de Laat WL *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 768  
[5] Evans E *et al.* *EMBO J*, 1997, **16**: 625  
[6] Tu Y *et al.* *J Biol Chem*, 1997, **272**: 20747  
[7] Conaway RC *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 7356  
[8] Egly JM. *FEBS Lett*, 2001, **24884**: 124  
[9] Lehmann AR. *Genes Dev*, 2001, **15**: 15  
[10] Jawhari A *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 31761  
[11] Flores O *et al.* *J Biol Chem*, 1992, **267**: 2786  
[12] Weeda G *et al.* *Cell*, 1990, **62**: 777  
[13] Poterszman A *et al.* *Trends Biochem Sci*, 1997, **22**: 418  
[14] Kugel JF *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 40483  
[15] Tirode F *et al.* *Mol Cell*, 1999, **3**: 87  
[16] Holstege FC *et al.* *EMBO J*, 1997, **16**: 7468  
[17] Fukuda A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1206  
[18] Moreland RJ *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 22127  
[19] Douziech M *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 8168  
[20] Hwang JR *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**: 15898  
[21] Evans E *et al.* *EMBO J*, 1997, **16**: 6559  
[22] Wang QE *et al.* *DNA Repair (Amst)*, 2003, **2**: 483  
[23] Spillare EA *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 1355  
[24] Wang XW *et al.* *Genes Dev*, 1996, **10**: 1219  
[25] Hwang BJ *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 424  
[26] Capovilla A *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **518**: 144  
[27] Jaitovich-Groisman I *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 14124  
[28] Elmore LW *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 14707  
[29] Capovilla A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**: 806  
[30] Prost S *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 33327  
[31] Jia L *et al.* *In J Cancer*, 1999, **80**: 875

## The Molecular Mechanism of XPB Gene in Nucleotide Excision Repair and Gene Transcription

Xiao-Dong Hu, Ji -Xiang Zhang\*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

**Abstract** Nucleotide excision repair (NER) mechanism is essential for the maintenance of organism genome integrity. Human xeroderma pigmentosum group B (XPB) gene, also named excision repair cross complementing 3 (ERCC3), which codes the largest p89 subunit of the basal transcription factor TFIIF and involves in both NER pathway and RNA polymerase II (RNAP II) transcription. XPB, as the essential component of NER, presents a unique 3'→5' ATP-dependent single-stranded DNA (ssDNA) helicases which is absolutely required and indispensable for unwinding and opening the DNA around both a promote in RNAP II transcription and /or a lesion in NER functions. Mutations in human XPB gene are associated with three genetic disorders: xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne's syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD), the phenotypes of which could be explained by specific deficiencies in both transcription and DNA repair. In addition, what's intriguing finding is the physical and functional interaction of XPB with p53.

**Key words** xeroderma pigmentosum group B; nucleotide excision repair; TFIIF; DNA repair; gene transcription

Received: October 19, 2004 Accepted: December 21, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30360037)

\*Corresponding author. Tel: 86-791-6292706, Fax: 86-791-6262262, E-mail: jixiangz@163.net