

# 检控蛋白 Rad17 在小鼠睾丸精子发生过程中的表达及其磷酸化变化

欧阳高亮\* 江瑞胜 毛宇彬 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, 厦门 361005)

**摘要** Rad17是细胞周期检控点信号转导过程中的一个关键检控蛋白,在DNA损伤检控和DNA复制检控中具有重要功能。但Rad17在细胞减数分裂中的检控作用还不是很清楚。因细胞减数分裂在睾丸组织中非常活跃,应用Western印迹检测Rad17在不同发育时期的小鼠睾丸组织中的表达及其磷酸化水平,并应用免疫组化的方法检测小鼠睾丸组织不同时期生殖细胞内Rad17的表达变化。结果显示Rad17在小鼠睾丸组织内高表达,而在肝、肾等组织中表达水平较低;Rad17在不同周龄的小鼠睾丸组织中均高水平表达,但在4周龄以后的小鼠睾丸组织中其磷酸化水平明显升高;免疫组化结果显示Rad17在精原细胞、精母细胞的细胞核中高表达,但在成熟精子细胞中消失。这些结果提示Rad17在小鼠睾丸生殖细胞减数分裂过程中也起重要检控作用。

**关键词** 细胞周期检控点; Rad17; 减数分裂; 睾丸; 小鼠

细胞周期检控点是一复杂的信号转导网络系统,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<sup>[1-3]</sup>。细胞周期检控点主要由一系列相关的检控蛋白相互作用所组成,这些检控蛋白构成检控系统的感受器、转导器和效应器,从而对细胞周期进行检控并产生相应的生物学效应。目前人们已鉴定出多个检控蛋白,如:ATM、ATR、Rad17、Chk1、Chk2、Brca1和Brca2等,这些检控蛋白在酵母和哺乳动物之间往往具有高度的保守性<sup>[4,5]</sup>。

Rad17是DNA损伤检控和复制检控信号转导过程中的一个至关重要的早期检控蛋白。当细胞核DNA受到损伤或DNA复制受阻时, Rad17能够被ATM和ATR检控激酶快速磷酸化<sup>[2,6]</sup>,从而激活细胞周期检控点的信号转导,并诱导DNA损伤修复等<sup>[2,5,6]</sup>。Rad17可替代复制因子C140亚基(RFC140),与RFC36、RFC37、RFC38、RFC40形成一个类似RFC的复合物,而Rad9、Rad1和Hus1可形成一个类似增殖细胞核抗原(PCNA)的9-1-1复合物。当细胞内出现DNA损伤或者DNA复制受阻时, Rad17能够协助9-1-1复合物结合到损伤位点<sup>[7,8]</sup>。这种结合对于细胞周期检控点的信号转导及DNA损伤修复具有非常重要的意义。

有关Rad17在体细胞有丝分裂过程对DNA损伤

和复制的检控功能及其对维持遗传稳定性的作用已得到较为深入的研究。但对Rad17在生殖细胞减数分裂周期和DNA重组中的检控功能还所知甚少。本文以雄性小鼠为实验材料,研究Rad17在小鼠睾丸组织精子发生过程中的表达。这将有助于揭示哺乳动物生殖细胞减数分裂细胞周期检控点调控的分子机制,同时对预防因生殖细胞遗传不稳定性而引起的疾病具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

昆明系小鼠由厦门大学抗癌研究中心实验动物培养室提供。选取2、3、4、5、6和8周龄雄性小鼠,解剖取其睾丸等组织,以用于各种实验。Rad17(H-300)抗体和Tubulin抗体购自Santa Cruz公司,磷酸化Rad17(Rad17pS635)抗体由国外合作实验室(Duke医学中心药理与肿瘤生物学系王晓凡教授实验室)提供。

### 1.2 Western印迹

收稿日期: 2005-01-28 接受日期: 2005-04-06

国家自然科学基金(No.30170463、No.30370307、No.30400239)、福建省青年科技创新专项重点项目(No.2003J017)和厦门大学科学研究基金(No.2003XDYY31)资助

\* 通讯作者。Tel: 0592-2186091, Fax: 0592-2188101, E-mail: oyglidz@yahoo.com.cn

将解剖得到的小鼠睾丸在4℃的PBS溶液中剪碎,挤压,然后用滤网滤去组织碎片,收集过滤后所得的溶液,离心,裂解。吸取少量的细胞裂解液,酶标仪检测总蛋白质浓度。变性,取等量蛋白质样品进行8%SDS-PAGE电泳。转膜,用含5%脱脂牛奶的TBST封闭1h,一抗(1:2000)室温温育1.5h,二抗(1:10000)室温温育1h。ECL工作液温育,暗室显影,定影。

### 1.3 免疫组织化学

将解剖得到的40日龄成熟小鼠睾丸用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。脱蜡复水,3% $H_2O_2$ 温育20min以去除内源性过氧化物酶活性,抗原修复5min,5%山羊血清室温封闭1h。一抗(1:100)4℃温育过夜,二抗室温温育15min,DAB显色,苏木精复染,脱水,封片剂封片,显微镜观察拍照。阴性对照在一抗温育这一步骤中用经纯化的重组Rad17饱和温育的一抗作为阴性IgG,其他步骤和正常的免疫组化相同。

## 2 结果

### 2.1 Rad17 在小鼠睾丸组织中高表达

由于睾丸组织是减数分裂DNA重组频繁发生的地方,DNA重组过程可能会出现遗传损伤,而Rad17是DNA损伤检控点调控过程中起重要作用的检控蛋白,因此应用Western印迹比较Rad17在睾丸组织与肝、肾等组织内的表达。结果显示Rad17在小鼠睾丸组织内高表达,而在小鼠肝、肾、肺、心和脑等组织中表达水平相对较低(图1)。

### 2.2 Rad17 在不同发育时期小鼠睾丸组织中的表达及其磷酸化变化

雄性哺乳动物性成熟前后的生精能力有所不同,不同发育时期哺乳动物睾丸组织内的检控蛋白表达水平变化还没有相关的研究报道。解剖2、3、4、5、6、8周龄的小鼠,取睾丸组织,Western印迹检测Rad17在不同发育时期小鼠睾丸组织中的表达。检测结果显示2~8周龄小鼠睾丸生殖细胞内Rad17表达均较高,但不同周龄之间并不存在明显的表达差异(图2)。

Rad17的Ser635、Ser645位点在细胞内出现DNA损伤之后会发生ATM/ATR依赖性的磷酸化<sup>[6]</sup>,因此,相对于Rad17的总蛋白质表达量,其磷酸化程度更能体现细胞DNA损伤程度、检控蛋白的活化以及检控点机制的活化程度。进一步应用Western印

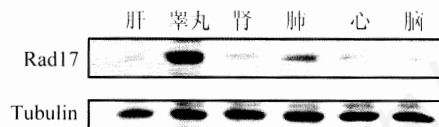


图1 Western印迹检测Rad17在小鼠睾丸、肝、肾等组织内的表达

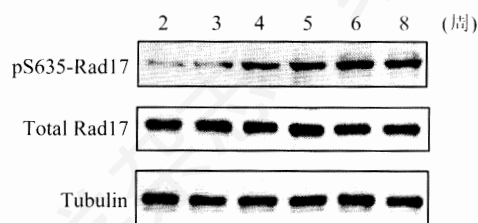


图2 Western印迹检测Rad17在不同发育时期小鼠睾丸组织中的表达及其磷酸化水平

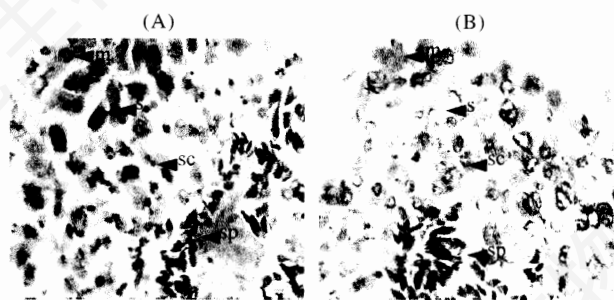


图3 免疫组化检测Rad17在小鼠睾丸组织中的表达与分布  
A: Rad17的检测结果; B: 阴性对照。m: 间质细胞; s: 精原细胞; sc: 精母细胞; sp: 精子细胞。

迹检测不同发育时期小鼠睾丸生殖细胞内Rad17的Ser635位点磷酸化水平,结果显示Rad17在2、3周龄小鼠睾丸组织中的磷酸化水平较低,但在4周龄以后的小鼠睾丸组织中处于高度磷酸化状态(图2)。这说明Rad17磷酸化与性成熟后睾丸组织中活跃的减数分裂有关。

### 2.3 Rad17 在成熟小鼠睾丸组织不同时期生殖细胞中的表达与分布

用免疫组化的方法研究Rad17在小鼠生殖细胞内的表达与分布,结果显示Rad17在精原细胞、精母细胞的细胞核中高表达,其表达呈现出从精原细胞到精母细胞、精子细胞依次递减的趋势,而间质细胞和精子内几乎不表达(图3)。

## 3 讨论

细胞周期检控点是细胞内调节细胞周期时序转换有序进行、确保细胞基因组完整性和遗传稳定性的重要调控机制。相对于有丝分裂过程中的细胞周

期检控点的研究, 减数分裂作为一种特殊的有丝分裂, 由于只发生在特殊细胞的特殊时期, 其细胞周期检控点的研究远落后于有丝分裂过程细胞周期检控点研究。生殖细胞在减数分裂同源重组的早期会产生大量的 DNA 双链断裂(DSB), 细胞内机制能够检测到未修复的 DSB 并阻止减数分裂细胞周期下游事件的发生。如果这些 DSB 无法在细胞退出前期 I 之前得到完全修复, 就会对细胞造成致命的损伤<sup>[9]</sup>。因此减数分裂过程中的细胞周期检控点调控分子机制研究就显得非常重要。

Rad17 是有丝分裂细胞周期检控点调控过程中起重要作用的检控蛋白。DNA 损伤诱导 Rad17 发生 ATM/ATR 依赖性的磷酸化, 是细胞内出现 DNA 损伤之后引发细胞周期阻滞所需的, Rad17 基因突变可导致细胞出现严重的 DNA 损伤检控点功能缺陷<sup>[6,10]</sup>。目前有关 Rad17 在减数分裂中的作用已有零星的报道<sup>[11]</sup>, 有研究发现芽殖酵母 Rad24(人 hRad17 的同源类似物)能够监控减数分裂的重组过程, 而且 Rad24 与 Ddc1/Mec3/Rad17(9-1-1 复合物的同源类似物)之间是以类似于哺乳动物的方式起作用。而且 Rad24 能够确保只有那些完成了重组交换的芽殖酵母细胞才能进入第一次减数分裂。即使那些 Rad24 缺陷时未完成重组的细胞可越过这种细胞周期阻滞而提前进入减数分裂期, 但产生的孢子的存活率也会大大降低。因此进一步研究哺乳动物生殖细胞减数分裂过程中的 Rad17 的表达模式将有助于深入认识 Rad17 的功能。

本文研究结果显示, Rad17 在小鼠睾丸组织内高表达, 而在小鼠的肝、肾等组织内表达量相对较低, 这表明 Rad17 在细胞减数分裂旺盛的睾丸组织内的表达水平较高, 显示出 Rad17 与 DNA 重组检控密切相关。我们进一步的研究结果显示, Rad17 在性未成熟的 2、3 周龄的小鼠睾丸组织中的磷酸化水平较低, 但在性成熟的 4 周龄以后的小鼠睾丸组织处于高度磷酸化状态。已有研究表明, 小鼠出生后第 1 周睾丸发育处于静止期, 第 2 周到第 4 周之间睾丸开始出现增殖、分化, 第 5 周之后进入成熟期, 睾丸组织内出现大量的精子。因此我们的结果

表明 Rad17 的磷酸化程度在性成熟的小鼠体内均处于较高水平, 预示着小鼠在性成熟之后, 其体内的生精活动一直维持在较高水平。在睾丸生殖细胞减数分裂过程, Rad17 磷酸化水平升高可能与减数分裂检控点信号转导有密切关系。

免疫组化的检测结果显示 Rad17 主要在小鼠的精原细胞和各级精母细胞中表达, 而在间质细胞和已经完成减数分裂的精子细胞、精子中几乎不表达或表达很弱。据此我们认为, Rad17 的表达量随着生殖细胞的成熟而逐渐降低很可能与各级精母细胞内的染色体重组有关。精原细胞还没有进入减数分裂期, 但连续进行着有丝分裂, Rad17 参与的细胞周期检控点机制对有丝分裂过程中的 DNA 复制等过程进行检控; 初级精母细胞减数分裂前期 I 发生的同源染色体重组交换会产生大量的 DNA 双链断裂; 初级精母细胞进行了一次分裂之后会产生两个次级精母细胞, 姐妹染色单体还没有分开; 精子细胞内只有单倍的染色体, 细胞结构也较为简单, 除了遗传物质之外很少有其他的物质。因此从检控蛋白表达量来分析, 精原细胞和精母细胞由于其细胞内较为复杂的染色体行为而使得检控点机制高度活化, 其细胞内的 Rad17 表达量也处于较高的水平, 而精子细胞内很可能是由于简单的染色体行为和细胞结构及功能, 因此 Rad17 的表达量处于较低的水平, 精子及间质细胞则几乎不表达。这些结果表明 Rad17 的表达与小鼠睾丸生殖细胞减数分裂过程中 DNA 重组、修复等的检控密切相关, Rad17 对维持生殖细胞基因组的稳定性和完整性也起着重要作用。

#### 参考文献 (References)

- [1] Zhou BB *et al. Nature*, 2000, **408**: 433
- [2] Elledge SJ. *Science*, 1996, **274**: 1664
- [3] Abraham RT. *Genes Dev*, 2001, **15**: 2177
- [4] 刘 敏等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 210
- [5] 江瑞胜等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 209
- [6] Bao S *et al. Nature*, 2001, **411**: 969
- [7] Venclovas C *et al. Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 2481
- [8] Bermudez VP *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 1633
- [9] Roeder GS *et al. Trends Genet*, 2000, **16**: 395
- [10] Bao S *et al. Cell Growth Diff*, 1998, **9**: 961
- [11] Hong EJ *et al. Genes Dev*, 2002, **16**: 363

## Expression and Phosphorylation of Rad17 Checkpoint Protein during Spermiogenesis in Mouse Testis

Gao-Liang Ouyang\* , Rui-Sheng Jiang, Yu-Bin Mao, Shi-Deng Bao

(*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** Rad17 is one of critical checkpoint proteins in cell cycle checkpoint signaling pathways and plays vital roles in DNA damage checkpoint and DNA replication checkpoint. However, the role of Rad17 in meiotic checkpoint is poorly understood. Since meiosis is very active in adult testis, we investigated the expression and phosphorylation change of Rad17 in mouse testis at different stages by Western blot analysis, and examined the expression of Rad17 in the germ cells at different meiotic stages in testis by Immunohistochemistry. Our results revealed that Rad17 protein was overexpressed in mouse testis tissues, while other tissues such as liver and kidney expressed much lower Rad17. Although Rad17 expression remained high level in mouse testis at different development stages, the phosphorylation level of Rad17 was significantly increased after four weeks of birth. Immunohistochemical analysis indicated that Rad17 protein was present primarily in the nuclei of spermatogonia and spermatocyte, and disappeared in the matured spermatids. These results showed that Rad17 also played an important role in meiotic checkpoint during germline development in testis.

**Key words** cell cycle checkpoints; Rad17; meiosis; testis; mouse

---

Received: January 28, 2005      Accepted: April 6, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170463, No.30370307, No.30400239), Innovation Project Foundation of Fujian Province for Young Scientists (No.2003J017) and Science Research Foundation of Xiamen University (No.2003XDYY31)

\*Corresponding author. Tel: 86-592-2186091, Fax: 86-592-2188101, E-mail: oygz@yahoo.com.cn