

细胞周期检控蛋白 Rad17

江瑞胜 刘敏 李程 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, 厦门 361005)

摘要 Rad17是细胞应答DNA损伤和复制又阻滞信号转导过程中一个关键的检控蛋白,在DNA损伤和DNA复制检控中具有非常重要的作用。现对Rad17在DNA损伤检控、DNA复制检控、端粒结构稳定以及减数分裂细胞周期检控中的重要作用进行综述,并探讨Rad17与肿瘤发生的关系。

关键词 细胞周期检控点; Rad17; DNA损伤检控点; DNA复制检控点; 肿瘤

细胞周期检控点(cell cycle checkpoints)是一复杂的细胞周期调控机制,主要调节细胞周期的时序转换,以确保DNA复制、染色体分离等细胞重要生命活动的高度精确性,并对DNA损伤、DNA复制受阻、纺锤体组装和染色体分离异常等细胞损伤及时做出反应,以防止突变和遗传不稳定的发生,维持细胞的遗传稳定性和完整性^[1-4]。

细胞周期检控点主要是由一系列检控蛋白相互作用所构成的复杂的信号转导网络。目前人们已从酵母等生物中分离鉴定出多种检控蛋白,如ATM、ATR、Rad17、Rad9、Rad1、Hus1、Chk1和Chk2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。许多研究也表明,检控蛋白的功能缺陷可导致细胞遗传不稳定性,进而可能诱发细胞癌变^[5-7]。Rad17是应答DNA损伤检控和复制压力信号转导过程中的一个至关重要的早期检控蛋白。本文结合国内外近年来的研究进展,对Rad17的结构及其在细胞周期检控等细胞生命活动中的功能作一个简要综述。

1 Rad17基因及其表达产物

人们先后在芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中分别发现scRad24基因及其同源基因spRad17^[8,9]。基于细胞周期检控点调节机制从简单的单细胞真核生物到哺乳动物较为相似,在进化过程中较为保守,人们随后又分别在小鼠和人中分离克隆出scRad24的同源基因mRad17和hRad17^[10-12]。其中hRad17基因位于人类的染色体5q12-13.1,含14个外显子,其表达产物hRad17与scRad24、spRad17分别有51%、46%的同源性,为亲水性蛋白质,由670个氨基酸的组成,

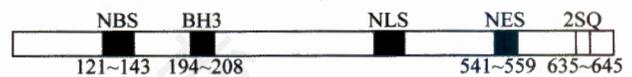


图1 hRad17的结构特征^[12]

分子量约75 kDa^[12]。hRad17 N端121~143有一个核苷结合位点(nucleotide-binding site, NBS), 194~208序列有一个BH3结构域(Bcl-2 homologous domain 3),靠近C端的541~559是一段核输出信号(nuclear export signal, NES),而635和645是两个ATR/ATM磷酸化位点(图1)。

2 Rad17参与细胞周期检控点调控

2.1 Rad17在DNA损伤检控点、DNA复制检控点中的作用

应对DNA损伤或复制压力的信号传递链是一个多分支、精确协调的网络,由一系列相关蛋白质构成相应的信号起始感受器、转导器和效应器。DNA损伤和DNA复制检控点的启动首先是识别DNA损伤和DNA复制又受阻。目前研究表明, Rad17是应答DNA损伤检控和复制压力信号转导过程中的一个至关重要的早期检控蛋白,对于检控点信号的活化和转导起重要作用。

以酵母等生物为模型的研究结果表明, DNA复制时复制因子C1~复制因子C5(RFC1~RFC5)复合物特异性识别模板和3'引物的结合处,并将同源三聚体

收稿日期: 2008-02-15 接受日期: 2008-05-04

国家自然科学基金(No.30370307, No.30400239, No.30570935)和厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助

通讯作者: Tel: 0592-2186091, Fax: 0592-2188101, E-mail: oyglzd@yahoo.com.cn

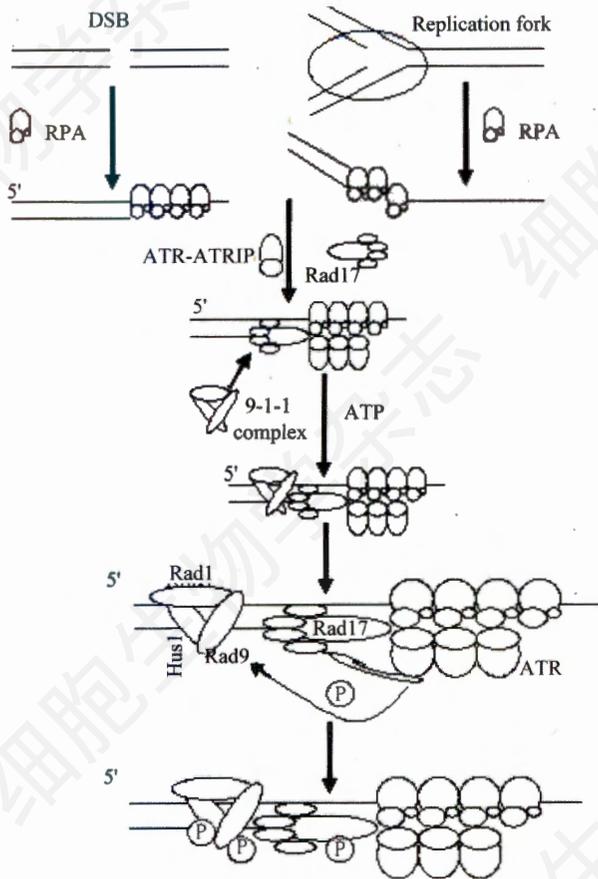


图2 Rad17参与应答DNA损伤和复制叉阻断^[19]

增殖细胞核抗原(PCNA)形成的环状钳形滑动夹引导至DNA上,滑动夹进一步促进了DNA聚合酶 δ 与模板DNA的结合延伸^[13,14]。Rad17具有与RFC类似的核苷结合结构域, Rad17能替代RFC1与其他4个RFC亚基(RFC2~RFC5)形成类RFC复合物的结构, Rad9、Rad1和Hus1则构成结构上类似PCNA的异源三聚体9-1-1复合物, 9-1-1复合物可在DNA上滑动并持续对基因组扫描以监测DNA损伤^[10,15-17]。与RFC将PCNA定位于染色质DNA上类似, Rad17-RFC复合物能结合缺口DNA, 依赖ATP介导9-1-1复合物结合到染色质上, 且ATP水解时, 9-1-1复合物将脱离Rad17并沿双链DNA滑动(图2)。

Rad17识别损伤的机制还不是很清楚, 有研究显示, 复制蛋白A(RPA)能够促进Rad17-RFC复合物结合单链DNA(ssDNA), 并促进Rad17介导的9-1-1复合物结合ssDNA。DNA双链损伤会因为核酸酶作用留出3' ssDNA凸出端, 同样阻断的复制叉也会产生ssDNA^[18]。RPA可结合DNA形成RPA-ssDNA复合物, 它不仅能促进ATR-ATRIP

汇集到这类位点, 也可促进Rad17-RFC复合物和9-1-1复合物的汇集。这些复合物间的相互作用对ATR磷酸化相应底物(包括Rad17)很关键, 同时也起始了检控点信号的传递^[19]。另有研究表明, hRad17的Ser635、Ser645位点在细胞内出现DNA损伤或复制受阻时会发生ATM/ATR依赖性的磷酸化, 该磷酸化将促进Rad17与9-1-1复合物的结合, 这两个位点的突变可导致细胞出现检控点功能的缺陷^[20]。

2.2 Rad17与端粒结构稳定

DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB)通常会导致细胞生长停滞和对损伤末端的修复, 而染色体末端的端粒帽状结构可以避免被识别为断裂的DNA。有功能的端粒可通过一套复杂的机制来调控DNA损伤反应以维持染色体末端结构的完整^[21]。在对替代性端粒延长(alternative lengthening of telomeres, ALT)机制的研究发现Rad17很可能在维持端粒长度稳定中发挥重要作用。在ALT细胞中有种特殊的核内结构称作APB体(ALT-associated promyelocytic leukemia body), 端粒DNA能存在该小体中。免疫荧光结果显示hRad9、hHus1、hRad1和hRad17都是APB体组成成分, DNA双链断裂的分子标记的磷酸化H2AX(γ -H2AX), 也共定位于APB体中, 表明9-1-1复合物和Rad17均参与调控端粒长度并且与端粒相结合。进一步的研究还发现APB体中存在DNA合成, 应用PI-3K类激酶的抑制剂则可抑制DNA合成^[22]。我们的初步研究也发现, 应用RNAi技术将Rad17基因表达剔低可导致端粒迅速变短, 而应用RNAi技术将端粒酶hTER剔低可导致Rad17 S635和S645两个磷酸化位点磷酸化。这些研究表明, Rad17能以类似识别DSB的方式将端粒DNA募集到APB体上来, 在APB体上通过某种依赖PI-3K类激酶的方式来合成DNA从而维持端粒长度的稳定。

2.3 Rad17在减数分裂细胞周期检控点中的作用

作为一种特殊的有丝分裂方式, 减数分裂既具有类似于普通有丝分裂的细胞周期检控机制, 同时也具有一些较为特殊的作用方式^[23]。有丝分裂过程中少量的DNA双链断裂就可导致细胞周期阻滞, 而芽殖酵母减数分裂时每个细胞至少发生200多处DSB, 基因重组事件可增加100~1000倍, 而事实上基因重组就是由DSB启动的^[24]。研究表明减数分裂需要检控蛋白功能的正常发挥, 检控蛋白的突变可引起异常的重组或染色体联会, 导致细胞停滞在减数分裂的第一次分裂的前期(前期I)的粗线期^[25]。

Rad17在减数分裂中的作用目前研究较少,有关研究主要集中在芽殖酵母 scRad24 在减数分裂中的作用。芽殖酵母 scRad24-RFC 与 Rad17-Mec3-Ddc1 复合物能识别不完全的基因重组并活化 Mec1/Esr1 激酶,随后 Mec1/Esr1 将磷酸化一些减数分裂特有的蛋白质,如 Mek1/Mre4 激酶、Red1^[26,27]。scRad24 的一些点突变可导致异常基因重组,即非姐妹染色体间的重组^[28]。scRad24 可通过促进减数分裂联会复合体的正确装配,以促进细胞对 DSB 的有效修复。scRad24 的缺失,可导致 DSB 修复的延滞^[29]。显然 scRad24 对芽殖酵母减数分裂的监控具有非常重要的作用。

此外,近来在小鼠中的研究发现, Rad17 在小鼠睾丸组织内高表达,而且在 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 在精原细胞和精母细胞的细胞核中高表达,而在间质细胞和精子细胞内几乎不表达^[30]。

这些研究提示在酵母以及哺乳动物细胞的减数分裂过程中, Rad17 一方面发挥其类似于在有丝分裂过程中具有的维持细胞基因组稳定性和完整性的检控作用,同时也促进细胞在减数分裂过程中进行正常的基因重组。因此 Rad17 在减数分裂中所起的作用有待进一步深入研究。

3 Rad17与肿瘤

细胞周期检控点的功能主要是对 DNA 损伤、DNA 复制受阻、纺锤体组装和染色体分离异常等细胞损伤做出有效应答,以维持细胞遗传的稳定性和完整性。而大量的研究表明,各种内源性和外源性的 DNA 损伤以及染色体数异常是导致人类肿瘤发生的一个重要原因,因此细胞周期检控点信号转导通路正常功能的缺陷很可能与肿瘤的发生密切相关^[31-34]。

hRad17 基因定位于染色体 5q12-13.1, 目前已知许多人类肿瘤该区缺失。有研究显示, Rad17 基因缺失可能是头颈部肿瘤基因组不稳定的原因之一^[35]。裂殖酵母 Rad17 基因缺失可导致细胞染色体丢失的概率增加 8 倍^[36]。细胞 Rad17 缺失不仅会积累 DNA 双链断裂,而且可导致染色体异常和高频的核内复制,表明 Rad17 对维持染色体稳定性具有非常重要的作用^[7]。

有趣的是, Rad17 在一些肿瘤中高表达。Rad17 在人结肠癌中高表达^[12]。有报道在 64 例乳腺癌患者中有 35 例(54.7%)癌组织 Rad17 mRNA 过表达,在这 35 例过表达的肿瘤组织中又有 24 例(68.6%)淋巴结

呈阳性,而其他 Rad17 mRNA 未过表达的 29 例中仅有 8 例(27.6%)淋巴结呈阳性,表明 Rad17 基因可能与人乳腺癌淋巴结转移有关^[37]。另外,74% 的非小细胞肺癌原位癌组织中 hRad17 高表达^[38], hRad17 mRNA 高表达的 41.9% 病人会出现淋巴结阳性,而 hRad17 mRNA 未高表达的病人仅有 18.3% 呈淋巴结阳性,因此 hRad17 mRNA 水平可能与非小细胞肺癌淋巴结转移有关^[39]。

近来有研究显示,脑瘤肿瘤干细胞能比非肿瘤干细胞的脑瘤细胞对 DNA 损伤做出更为明显的应答, Rad17 等检控蛋白的磷酸化水平更强,表明脑瘤肿瘤干细胞比非肿瘤干细胞的脑瘤细胞对放射等造成的 DNA 损伤具有更强的 DNA 修复能力,从而具有更强的对 DNA 损伤的耐受性,这也是脑瘤对放疗具有耐受并易复发的重要原因^[40]。

因此, Rad17 高表达或磷酸化水平升高可能与肿瘤细胞对 DNA 损伤压力具有更强的耐受性有关,而其缺失或低表达则可能导致细胞突变率升高以及对放疗和化疗的敏感性增强^[12]。表明 Rad17 的正常表达与其参与 DNA 损伤和 DNA 复制检控以维持细胞基因组稳定的功能密切相关。

4 展望

综上所述,作为 DNA 损伤和复制检控点一个早期关键因子, Rad17 对检控点信号的活化和转导起着非常重要的作用,其功能的缺失可直接影响细胞感受外界不良环境及其随后诸多应答事件,影响细胞的生存和基因组的稳定,并最终引起细胞凋亡或细胞癌变。虽然目前对 Rad17 的功能已经有一定的研究,但对于诸如 Rad17 磷酸化后如何被去磷酸化酶调节,以便细胞重新进入细胞周期; Rad17 功能缺陷与细胞癌变的关系; Rad17 在减数分裂细胞周期检控点中的具体作用分子机制以及 Rad17 在胚胎发育中的功能都有待深入研究。因此更全面地了解 Rad17 等细胞周期检控蛋白的功能,将有助于进一步深入认识细胞 DNA 损伤检控和 DNA 复制检控的具体分子机制,也将有助于进一步揭示细胞癌变的分子机制,并为针对细胞周期检控异常进行干预开辟新的肿瘤治疗新途径。

参考文献 (References)

- [1] Zhou BB *et al.* *Nature*, 2000, **408**: 433
- [2] Elledge SJ. *Science*, 1996, **274**: 1664
- [3] 江瑞胜等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 209

- [4] 蔡秋凤等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 479
- [5] Motoyama N *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**: 11
- [6] Dang T *et al. Genes Cells*, 2005, **10**: 287
- [7] Wang X *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 965
- [8] Weinert TA *et al. Genes Dev*, 1994, **8**: 652
- [9] Parker AE *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 18340 Erratum in: *J Biol Chem*, 1999, **274**: 24438
- [10] Bluysen HA *et al. Genomics*, 1999, **55**: 219
- [11] Bao S *et al. Cell Growth Diff*, 1998, **9**: 961
- [12] Bao S *et al. Cancer Res*, 1999, **59**: 2023
- [13] Tsurimoto T *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 1023
- [14] Majka J *et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2004, **78**: 227
- [15] Naiki T *et al. Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 5888
- [16] Venclovas C *et al. Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 2481
- [17] Parrilla-Castellar ER *et al. DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**: 1009
- [18] Kai M *et al. Mutat Res*, 2003, **532**: 59
- [19] Zou L *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 13827
- [20] Bao S *et al. Nature*, 2001, **411**: 969
- [21] 李程等. *细胞生物学杂志*, 2006, **28**: 415
- [22] Nabetani A *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 25849
- [23] Lydall D *et al. Nature*, 1996, **383**: 840
- [24] Lichten M *et al. Annu Rev Genet*, 1995, **29**: 423
- [25] Bailis JM *et al. Cell*, 2000, **101**: 211
- [26] Roeder GS *et al. Trends Genet*, 2000, **16**: 395
- [27] Hong EJ *et al. Genes Dev*, 2002, **16**: 363
- [28] Grushcow JM *et al. Genetics*, 1999, **153**: 607
- [29] Shinohara M *et al. Genetics*, 2003, **164**: 855
- [30] 欧阳高亮等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 441
- [31] Hanahan D *et al. Cell*, 2000, **100**: 57
- [32] Bao S *et al. Cancer Cell*, 2004, **5**: 329
- [33] Gorgoulis VG *et al. Nature*, 2005, **434**: 907
- [34] Bartkova J *et al. Nature*, 2005, **434**: 864
- [35] Zhao M *et al. Head Neck*, 2008, **30**: 35
- [36] Griffiths DJ *et al. EMBO J*, 1995, **14**: 5812
- [37] Kataoka A *et al. Clin Cancer Res*, 2001, **7**: 2815
- [38] Wang X *et al. Cancer Res*, 2001, **61**: 7417
- [39] Sasaki H *et al. Lung Cancer*, 2001, **34**: 47
- [40] Bao S *et al. Nature*, 2006, **444**: 756

Cell Cycle Checkpoint Protein Rad17

Rui-Sheng Jiang, Min Liu, Cheng Li, Gao-Liang Ouyang*, Shi-Deng Bao

(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 important checkpoint proteins in DNA damage checkpoint and DNA replication checkpoint, and plays a vital role in responding to DNA damage and stalled replication forks. The roles of Rad17 in DNA damage checkpoint, DNA replication checkpoint, telomere length maintaining, meiotic checkpoint and tumorigenesis are reviewed in this paper.

Key words cell cycle checkpoint; Rad17; DNA damage checkpoint; DNA replication checkpoint; tumor

Received: February 15, 2008 Accepted: May 4, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370307, No.30400239, No.30570935) and the Program for New Century Excellent Talents in Xiamen University

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