

DNA 的复制, 阻止细胞的分裂, 为 DNA 修复系统提供充足的时间进行 DNA 修复, 以减少损伤的致死性, 或避免突变、重组或损伤的 DNA 进入子代细胞。

DNA 损伤可引起细胞 G1、S、G2 期阻滞^[2], 这一发现引发了研究 DNA 损伤如何转变成细胞周期阻滞信号并引起周期阻滞过程的兴趣。一般认为, 这一过程分三个阶段: a. DNA 损伤的识别, b. 损伤信号传导到效应分子, c. 效应分子造成细胞周期阻滞。

1 DNA 损伤的识别

DNA 损伤或者表现为 DNA 链上出现沟 (由链断裂引起, 或修复时对碱基的切除引起), 或者表现为 DNA 双螺旋构象的改变, 或者出现自由 DNA 末端, 很可能正是这些结构上的改变为损伤识别分子提供了识别的基础^[3,4]。

哺乳动物细胞中识别 DNA 损伤并启动蛋白激酶瀑布效应引起细胞周期阻滞的首要分子是 DNA 活化的蛋白激酶 (DNA-activated protein kinase, DNA-PK)^[5], DNA-PK 是一种哺乳类细胞蛋白质/苏氨酸激酶, 位于细胞核, 它由分子质量为 450 ku 的催化亚基 (p450) 和称为 Ku 的自身抗原两个部分组成, 后者由两个紧密结合的同源亚基构成, 其分子质量分别为 70 和 80 ku, 它们可以与 DNA 的自由末端结合。人类的 DNA 链断裂修复基因 XRCC5 和 XRCC7 与 Ku80 和 Ku70 亚基相同。DNA-PK 的激活需要游离 DNA 片段, 但无 DNA 序列特异性, 实验证明^[6] Ku 与游离 DNA 的结合是激活催化亚基的必要条件。游离 DNA 片段在 DNA 复制、重组和转录以及 DNA 损伤的过程中都可出现。DNA-PK 的作用底物非常广泛, 有 DNA 结合蛋白 (如 p53) 和非 DNA 结合蛋白以及 p450 催化亚基本身, 其中 p53 的转录活性区有两个 DNA-PK 识别位点: Ser¹⁵ 和 Ser³⁷。Ser¹⁵ 磷酸化后 p53 寿命延长, 有利于 p53 发挥关卡作用。而 p53 的肿瘤抑制活性区中 Ser³¹⁵ 若被 Cdc2 磷酸化, 则可加速 p53 降解, 促进细胞周期进行。然而, 去除酵母中 Ku70 的同源基因 HDF1, 尽管在无细胞的细胞提取液中失去 DNA 末端结合能力, 而 G1、S、G2 检定点阻滞却不受影响, 说明还存在 DNA-PK 的替代途径。

p53 本身也是识别 DNA 损伤的分子, p53 及其 C 端结构能识别 DNA 分子中一种常见的插入/

缺失错配 (insertion/deletion mismatch, IDL) 损伤^[7]。p53 与 DNA 可形成两种复合物: 不稳定的复合物, 见于没有损伤但有自由端的 DNA; 高度稳定的复合物, 要求 DNA 上存在 IDL 错配。p53 的 C 端含多个碱性 α 螺旋区, 可识别 GT 错配, 与 3 个 T 碱基造成的膨胀紧密结合, 调节自身中间区域的结合能力, 结合后的构象改变可使 p53 的蛋白酶敏感位点隐藏。这样一个存在于 DNA 损伤位置的高度稳定的 p53 复合物可为形成参与 DNA 修复的多种蛋白质组装成复合物提供一个脚手架, 并可增强 p53 促进参与细胞周期调控、凋亡及 DNA 损伤修复分子表达的能力。

DNA 链断裂可激活裂殖酵母 Rad3 蛋白激酶 (人类 RAD3 类似基因是 ATM, ATR, XPD)^[8]。Rad3 是一个金属锌蛋白, 是一个单链 DNA 依赖的 ATP 酶, 同时它还具有 DNA、RNA 解旋酶活性, 易与 UV 损伤的 DNA 结合。这种结合依赖 ATP 的存在, 并与 DNA 分子的负超螺旋程度有关。Arg⁴⁶ 突变的 rad3 失去 DNA 解旋酶活性, 但不丧失与 DNA 结合的能力, 说明 Rad3 的 DNA 结合区与解旋酶区是分离的。Rad25 (XPB) 也具有单链 DNA 依赖的 ATP 酶活性和 DNA 解旋酶活性。它们都是 RNA 聚合酶 II (pol II) 的转录因子 TF IIH 的六个组成亚基之一, 对细胞的生存至关重要。此外, Rad14 (XPA) 是一种金属锌蛋白, 也具有特异性与 UV 损伤的 DNA 结合的能力, 在 Rad23 的辅助下可与 TF IIH 形成复合物。复合体的形成过程中 Rad3、Rad25 的作用以及复合体形成后的作用尚有待阐明。

pol ϵ 识别的 DNA 损伤似乎特异性引起 S 期阻滞^[9]。pol2 突变的细胞 G1、G2 期阻滞正常, 而与 G1、G2 检定点阻滞密切相关的 rad9 突变时, S 期阻滞不受影响。Navas 等发现单链 DNA 平面本身可作为一种标志, 表明存在有未复制的 DNA, pol ϵ 识别区的锌指对于 pol ϵ 与这个区域结合相当重要。

2 损伤信号的传递

DNA 损伤引起的细胞周期阻滞与许多机制有关, 其中包括 cyclins 的转录调控及其稳定性的改变, 以及 Cdk 磷酸化和 Cdk 抑制剂引起的活性改变。

许多证据表明 G2 检定点阻滞由 Cdc2 调节, CDC2 基因编码 34 ku 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活化是细胞分裂增殖的信号, 具有启动和诱发分裂的双重作用。DNA 损伤可导致丝状曲霉菌、人类

细胞 (h) 和裂殖酵母 (sp) Cdc2 催化亚基的抑制位点磷酸化, 这种抑制性磷酸化造成 G2 检定点阻滞. 在上述三种生物中, 不能被磷酸化的 cdc2 突变体不能出现完全的周期阻滞. 而 Cdc2 的磷酸化与 Cdc25 密切相关, Cdc25 是 Cdc2 的主要激活因子. DNA 损伤后, 导致 G2 阻滞的 Cdc2 抑制性磷酸化发生于 Tyr15. 在裂殖酵母上进行的遗传研究提示, 这一磷酸化依赖于有活性的蛋白激酶 Wee1 (突变的细胞提前分裂, 细胞小) 的存在以及磷酸酶 Cdc25 的失活. 已有文献报道^[10], 人类 Cdc25 在 DNA 损伤后出现 Ser²¹⁶磷酸化, 这正是 Cdc25 失活的原因, 不能磷酸化的 cdc25 (Ser²¹⁶突变为 Ala) 不能产生 G2 检定点阻滞. hCdc25, spCdc25 均由 Chk1 (checkpoint kinase 1) (一种至少在裂殖酵母 DNA 损伤后周期阻滞时所需的蛋白激酶) 蛋白激酶催化磷酸化^[11-13]. DNA 损伤可激活 Rad3, Rad3 可通过磷酸化使 Chk1 激活, 但 Rad3 磷酸化 Chk1 的具体机制尚不清楚. Sanchez 等^[14]指出 Rad53 可能参予这一磷酸化过程. Rad53 可抑制细胞 Mec1⁻ (mitosis entry checkpoint, 一种与 rad3 类似的蛋白质) 引起的致死性, 是 DNA 损伤检定点和 S 期检定点阻滞所必需, 也是 DNA 损伤后转录所必需. Mec 突变后 Rad53 不能磷酸化, Tel (telomerase) 的过表达激活的 Chk1 使磷酸酶 Cdc25 的 Ser²¹⁶磷酸化. Chk1 无论在体内还是在体外都可结合 Cdc25 使其 Ser²¹⁶发生磷酸化. Cdc25 的磷酸化并不能抑制 Cdc25 的活性. Peng 等^[10]发现, 只有磷酸化的 Cdc25 才可与 14-3-3 (一组蛋白质, 可与信号分子包括磷酸酶结合) 结合, 从而与 Cdc2 分离, 导致 Cdc2 失活. 14-3-3 蛋白由 RAD24 和 RAD25 基因编码, 这两个基因与裂殖酵母损伤后的周期阻滞有关. 但在芽生酵母 Cdc2 的同源物 Cdc28 的抑制性磷酸化不足以解释 G2 阻滞. 含有不能磷酸化的 Cdc2 亚基的人类细胞仍可能出现 G2 阻滞, 这一事实表明在人类细胞中还存在与检定点阻滞有关的其他机制.

另外可能传导损伤后周期阻滞信号的蛋白是 c-Abl, 它可与 ATM 结合, ATM 基因已被克隆, 它编码一个核磷蛋白 ($M_r = 350\,000$), 其 C 端与 3-磷酸酯酰肌醇激酶家族的催化区同源. AT 细胞在电离辐射损伤后不能产生 G1、G2 细胞周期阻滞, 与 ATM 具有识别或对 DNA 损伤后产生反应有关. 此外 ATM 与 DNA-PK 的催化亚基同源, 也暗示它参与对 DNA 损伤的反应. ATM 通过一个位于中

心的脯氨酸富集区与 c-Abl 的 SH3 区域结合^[15], 细胞受到电离损伤后, c-Abl 的激活必须有 ATM 存在. 仅表达 ATM 的激酶区域可保持 c-Abl 的活性, Baskaran^[16]发现在 c-Abl 酪氨酸激酶区域的 serine⁴⁶⁵是 ATM 激活的重要靶点. 令人惊奇的是 ATM 激酶区域甚至可在没有 DNA 损伤时激活来源于 ATM 敲除小鼠的 MEFs (小鼠胚胎纤维母细胞) 的 c-Abl, 这个事实提示 c-Abl 的活化有其他机制参与, 保证了仅在 DNA 损伤时 c-Abl 才被 ATM 激活. 这种控制可能包括 ATM 分子的其他部分. 虽然 ATM 本身可能识别 DNA 损伤, 但也有可能其他蛋白识别 DNA 损伤后激活 ATM. Baskaran 等认为 ATM/c-Abl 反应通过 Pol II 磷酸化调节靶基因的表达, 或启动应激激酶通路如 SAPK/JNK. 电离辐射可刺激 c-Abl SH3 区与 DNA-PK 的 Ku 抗原结合, DNA-PK 通过磷酸化激活 c-Abl, 缺失 DNA-PK 的细胞经电离辐射后不能活化 c-Abl^[17]. c-Abl 在体外促进 DNA-PK 磷酸化从而反馈抑制其与 DNA 形成复合体的能力. 这个 DNA 损伤识别器怎样与效应器相联系引发细胞对损伤的反应, 最可能的媒介是 p53, 不仅因为这个蛋白在 DNA 损伤反应中很重要, 且因 AT 细胞中其损伤触发的活性丧失. 此外, DNA 损伤尚可触发 p53 与 c-Abl 的一个直接的物理联系, 但他们之间具体的信息传递过程尚不清楚. 另外 c-Abl 与 Rb 蛋白也有相互作用.

3 细胞周期调节

p16-CyclinD1-Cdk4/Rb 通路是调节 G1 至 S 过渡期的中心. 在几乎所有肿瘤细胞中都可以找出这条通路中某一基因的改变或突变. p16 (mts1) 是 CyclinD1-Cdk4 的负调节因子. Rb 是 CyclinD1-Cdk4 的主要靶点. Rb 调节 E2F-DP 转录因子复合体, 而这个复合体调节包括 CyclinE, CyclinA, 二氢叶酸还原酶 (DHFR), 增殖细胞核抗原 (PCNA) 等一系列基因的表达, 而这些基因产物是 S 期起始或进行所必需的条件. CyclinD1-Cdk4 与 RB 的结合使 Rb 磷酸化, 使 E2F-DP 从 Rb 上脱落, 解除对这些基因的抑制.

DNA 损伤后, 信息传导到 p53 蛋白, p53 激活, 半衰期延长, p53 促进 p21 的转录, p21 与多种 Cyclin、Cdk 复合物如 CyclinD1-Cdk4、CyclinE-Cdk2、CyclinA-Cdk2、CyclinA-Cdc2 等结合. 每个复合物结合一分子 p21 不影响 Cdk 活性, 甚至 p21

可作为一个辅助因子。而两分子的 p21 与复合物结合后则可抑制激酶活性, 阻断细胞周期。另外, p21 也可结合于 PCNA 的 C 端, 形成的 p21-PCNA 复合物在 DNA 复制时抑制 PCNA 的 DNA 聚合酶前进因子作用, 但不影响 DNA 修复。p21 缺失的鼠胚细胞只是部分失去 G2 阻滞, 表明还存在不依赖 p21 的 p53 介导的 G1 阻滞。GADD45 (growth arrest and DNA damage gene) 基因产物的过度表达, 也可导致 G1 阻滞, 这可能和 GADD45 与 PCNA 的结合有关。Rb 阴性小鼠也可以有 G1 阻滞, 因为还存在 Rb 的类似物 p107, p130, 它们可以影响 E2F-4 和 E2F-5。

p53 也参与 G2/M 期阻滞, 给予细胞纺锤体抑制剂, 例如 rocadazole。同时给予野生型 p53, 细胞周期阻滞在 G2 期, 如没有 p53, 则细胞重新开始 DNA 合成, 增加细胞的倍性, 即细胞成为多倍体。

DNA 损伤引起的细胞周期阻滞还有许多其他基因参与。这些基因产物在 DNA 修复过程中发挥着各种各样的作用。例如: 在辐射敏感的酵母突变株 rad9、rad17 及 rad24 受到 X 射线或 254nmUV 光照射损伤后, 启动 G2/M 周期阻滞能力丧失。另外 CDC13, MEC1-3 以及 RAD9 缺失细胞都失去 G1 期阻滞能力。

4 细胞周期阻滞失效

因为一系列的原因, 细胞周期检定点阻滞可能失效。首先, 如同所有其他体内过程, 检定点可以有一个内部错误率。其次, 如同其他信号传导系统, 细胞尽管存在没有修复的损伤, 也可出现适应现象, 阻滞的间隙过后, 细胞继续进行周期进程^[18]。而细胞检定点阻滞的失效可保持有利于自然选择的基因改变。细胞周期检定点丧失的后果主要由损伤类型和处于细胞周期的哪一个阶段决定。如果损伤在其产生阶段没有修复, 损伤的特性可在下一个阶段发生改变, 导致产生第二次损伤。例如, G1 期细胞有一个单链断裂, 在其通过 S 期时可转变为双链断裂。此外, 如果细胞在修复前即进入下一阶段则可能失去对某些修复方式的选择。

David 等指出 Cdc5 和 Ck II^[19] 控制酵母对 DNA 损伤引起的细胞周期检定点阻滞的适应, CDC5 编码一个完成分裂后期所必需的激酶, 它属于一个保守的称为水球样 (polo-like) 激酶的蛋白激酶家族, 在哺乳动物和非哺乳动物中都已发现它的同源物, 并认为它可催化多种底物磷酸化, 促进

有丝分裂, 并与纺锤体的形成有关。当 CDC5 突变后, 酵母失去在 DNA 损伤没有修复时通过检定点的能力。

5 结 语

DNA 损伤是生物体中经常发生的事件, 它引起的后果有时是非常严重的, 因此 DNA 损伤修复系统在生物体内具有重要的保护功能。DNA 损伤修复时需要其他非必需的细胞生理活动暂停, 为细胞提供良好的内部环境以便细胞集中精力完成修复, 细胞周期检定点阻滞在创造内部环境中起着非常重要的作用, 而检定点与 DNA 损伤的偶联就成为其中的关键。

在研究细胞周期阻滞时人们主要采用一些缺陷型细胞, 这些细胞缺失某种基因, 因而不能出现周期阻滞, 且对 UV 或电离辐射敏感, 通过对这些细胞的研究, 获得了大量的实验资料, 克隆了许多与损伤修复相关的基因。但是, 这种研究方式尚存在不足之处, 例如细胞内环境非常复杂, 存在多种基因, 各个基因功能的体现有赖于其他基因的功能。

迄今为止, 虽然已经对 DNA 损伤后细胞周期阻滞有了一定的了解, 但这些知识多较孤立, 不仅细胞周期阻滞的三个阶段之间的联系还非常模糊, 而且对各个阶段本身的认识还很不清楚。例如损伤识别阶段有什么蛋白质参与损伤的识别? 识别信号是什么? 在细胞周期的哪一个阶段参与识别? 识别后的信号传递系统是什么? 在细胞周期的各个阶段是否相同? 他们的效应器是什么、是否相同以及什么情况下产生适应等等, 所有这些都是很有意义的问题, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, **362** (6422): 709~ 715
- 2 Maity A, McKenna W G, Muschel R J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol*, 1994, **31** (1): 1~ 13
- 3 Siede W, Friedberg A S, Dianova I, *et al.* Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics*, 1994, **138** (2): 271~ 281
- 4 Weinert T, Lydall D. Cell cycle checkpoints, genetic stability and cancer. *Seminars Cancer Biol*, 1993, **4** (2): 129~ 140
- 5 Anderson C W. Protein kinases and the response to DNA damage. *Seminars Cell Biol*, 1994, **5** (8): 427~ 436
- 6 Gottlieb T M, Jackson S P. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 1993, **72** (1): 131~ 142
- 7 Suman L, Brian E, Arnold L, *et al.* P53 and its 14kDa C-

- terminal domains recognize primary DNA damage as insertion/deletion mismatches. *Cell*, 1995, **81** (7): 1013~ 1020
- 8 Elledge S J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 1996, **274** (5293): 1664~ 1683
 - 9 Navas T A, Zhou Z, Elledge S J. DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell*, 1995, **80** (1): 29~ 39
 - 10 Peng C H, Graves P R, Thomas R S. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25c on serine 216. *Science*, 1997, **277** (5331): 1501~ 1505
 - 11 Beth F, Nicholas R, Paul R. Cdc25 mitotic inducer targeted by Chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science*, 1997, **277** (5331): 1495~ 1497
 - 12 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. *Science*, 1997, **277** (5331): 1497~ 1501
 - 13 Walworth N C, Bernald R. rad-Dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science*, 1996, **271** (5247): 353~ 356
 - 14 Sanchez Y, Brain A D, William J J. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*, 1996, **271** (5247): 357~ 360
 - 15 Shafman T, Khanna K K, Kedar P, *et al.* Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 1997, **387** (6632): 520~ 523
 - 16 Baskaran R, Wod L D, Whitakev L L, *et al.* Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*, 1997, **387** (6632): 516~ 519
 - 17 Kharbanda S, Pandey P, Jin S F, *et al.* Functional interaction between DNA-PK and C-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 1997, **386** (6626): 732~ 735
 - 18 Sandell L L, Zakian V A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, 1993, **75** (4): 729~ 739
 - 19 Toczyski D P, Galgoczy D J, Hartwell L H. CDC5 and CKII control adaption to the yeast DNA checkpoint. *Cell*, 1997, **90** (6): 1097~ 1106

DNA Damage and Cell Cycle Control. YU Ting-Xi, ZHU Ying-Bao, TONG Tan-Jun¹⁾ (*The Third School of Clinical Medicine, Beijing Medical University, Beijing 100083, China; ¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract DNA damage and repair of damaged DNA can cause cell cycle arrest. This process is consisted of three periods: recognition of damage domain in the DNA, transduction of damage signal and cell cycle arrest. Sometimes, this kind of cell cycle arrest may be failed.

Key words DNA damage, cell cycle arrest, signal transduction