

DNA 依赖蛋白激酶研究进展*

江国春 袁丽珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 DNA 依赖蛋白激酶由 Ku 异二聚体和 DNA-PKcs 组成, 结合 Ku 蛋白后, DNA-PK 激酶活性激活, DNA 依赖蛋白激酶具有多功能性, 参与 DNA 修复、基因重组以及复制、转录等多种细胞学过程。

关键词 DNA 依赖蛋白激酶, Ku, DNA-PKcs, DNA 修复

学科分类号 R542.2

DNA 是射线作用的主要靶分子, 辐射损伤可被体内的化学反应迅速修饰, 而细胞内残存的 DNA 损伤则通过损伤监视系统纠正^[1], 此监视系统包括 DNA 损伤的识别、损伤信号传递、基因转录以及细胞反应 (图 1)。现在发现 DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-PK) 参与了 DNA 损伤的直接识别, 并且对于 DSB 修复、基因重组、基因转录以及基因调控等具有重要作用。



图 1 哺乳细胞内 DNA 损伤监视系统

1 DNA-PK 的生化特性

DNA-PK 由三个亚基组成: Ku70、Ku80 以及 DNA-PKcs, 其中 Ku70、Ku80 组成异二聚体, 是其调节亚基, DNA-PKcs 是其催化亚基。

1.1 Ku 蛋白亚基

Ku 由 Ku70 和 Ku80 异二聚体构成。人、小鼠的 ku70 基因分别定位于 22q13、15 号染色体上^[2], 分别编码 609 和 608 个氨基酸残基的蛋白质, 其上有 Glu、Asp 富含区和 Leu 拉链区。基因组 DNA 全长 24 kb, 有 13 个外显子。果蝇^[3] YPF-1 β 亚基是人 Ku70 结构类似物, 但其羧基端没有 DNA 结合区, 也没有 Leu 拉链。

1997 年 Hong 等^[4] 获得了 ku70 基因敲除小鼠: ku70 (-/-) 小鼠相对矮小, 对电离辐射 (IR) 超敏感, DNA DSB 修复缺陷, 其 T 细胞受体 (TCR) 基因重组以及 CD4⁺ CD8⁻ 和 CD4⁻ CD8⁺ T 细胞发育正常。导入限制性内切酶基因后, Ku70 突变细胞死亡, 而野生型细胞仍能存活, 表明 Ku70 在 DSB DNA 修复中有重要作用。

人 ku80 基因^[5] 定位于 2q33~35, 编码 732 氨

基酸残基的多肽, 此多肽有一个“Leu 拉链”, 有助于 Ku80 通过疏水区与 Ku70 异二聚体化。小鼠和兔的 ku80 基因定位于 1 号和 9 号染色体。ku80 敲除小鼠^[6] 表现 SCID、V (D) J 重组缺陷、DNA DSB 修复缺陷以及生长迟滞等。

Ku70/Ku80 作用区域目前尚有争论, Osipovich 等^[7] 认为位于 Ku80 中央区域 28 个氨基酸残基处 (449~477), 453~454 氨基酸残基突变将失去与 Ku70 结合的能力。Ku 基本功能是结合 DSB DNA, 当存在两个同源末端时, Ku 先结合其中一个 DNA 分子, 然后将其连接到另一个 DNA 分子上, 结合了 Ku 的线性 DNA 能被 DNA 连接酶环化。原子力显微镜 (AFM) 能观察到 Ku-DNA 相互作用时形成的 DNA 环^[8] (图 3)。Ku 能非特异性地结合到几乎所有双链断裂 (DSB) 末端, 包括 5'、3' 末端、平端以及茎环结构的双螺旋 DNA 末端。此外 Ku 及其类似物能特异性地结合在各种基因的启动子上, 目前发现有六类特异序列^[9] 存在: PSE-1 能结合 snRNA 基因 U1 的 PSE (proximal sequence element) 和 DSE (distal sequence element), Ku-2 能结合 DNA 双链、五聚体基序以及环状模板, 而 TREF 能识别 transferrin 受体启动子序列, E1BF 能识别兔 rRNA 增强子 130 bp 重复序列, CTCBF 特异结合 COL4A1 和 COL4A2 启动子 CTC 盒。Ku 能与众多基因调控序列特异结合, 但对其功能不甚了解。此外 RNA 能与 Ku 竞争结合 DNA 位点, 从而抑制 DNA-PK 的活性, 由于有多种 RNA 与 Ku 结合, 表明 RNA 可能是 Ku 的调节因子^[10]。

Tuteja 等^[11] 发现 Ku 具有 DNA 依赖的 ATPase

* 国家自然科学基金资助项目 (39900031)。

收稿日期: 1998-09-24, 修回日期: 1999-01-19

酶和螺旋酶活性, Ku 同源分子 DNA 螺旋酶 II 能在 DNA 链上由 3' → 5' 方向移动, 解开 DNA 双链, 从而使复制叉移动.

1.2 DNA-PKcs 亚基

人 DNA-PKcs 分子质量 465 ku, 与 Ku 蛋白异二聚体结合, 是 DNA-PK 的催化亚基, 参与 DNA DSB 的识别和修复. 此基因组 DNA^[12] 有 86 个外显子, 分布于长 250 kb 的核苷酸序列上, 外显子平均长度为 150 bp. 它是 scid (severe combined immune deficiency) 基因产物, scid 突变位点位于第 85 个外显子编码的 Tyr4046 上, 此基因位点纯合突变导致免疫缺陷、IR 超敏感以及 DNA DSB 修复缺陷. DNA-PKcs 激酶活性区域位于羧基端 (3719~ 4127 氨基酸残基之间), OK-1035 可抑制此激酶活性. 激酶活性区域属于 PI-3 激酶超家族^[13], 主要特征有: 分子质量大; C 端有 PI-3K 相关激酶结构域; 有特异性 N 端且具有 Leu 拉链结构. 此家族主要包括 DNA-PKcs、PARP、ATM、MEI-41、TEL1、MEG-1 和 RAD3 等 (图 2), 它们参与从 DNA 损伤到效应器的信号传递.

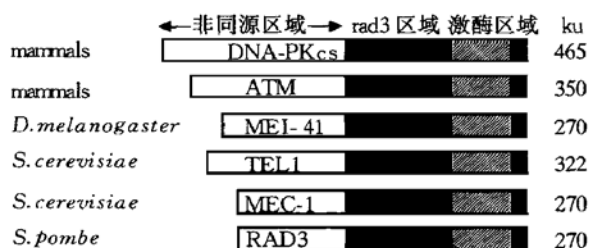


图 2 PI-3 激酶家族结构域比较

2 DNA-PK 在 V (D) J 重组中的作用

Ku 与 DNA 结合后, DNA-PKcs 被激活, DNA-PK 通过 DNA-蛋白质以及蛋白质-蛋白质两种机制实现其活性调节^[14]: a. 携带 DNA 的 Ku 激活 DNA-PKcs; b. DNA-PKcs 与 Ku 直接作用使之激活 (图 3). HMG1、HMG2 能激活 DNA-PKcs 与 DNA 结合活性, 转录因子 HSF1 能与 DNA-PKcs 和 Ku 特异结合, 从而增加二者之间活性复合物的形成. c-Abl Tyr 激酶与 DNA-PKcs 结合区位于 3002~ 3850 氨基酸残基处, c-Abl Tyr 激酶与 Ku 竞争结合此区域从而抑制 DNA-PKcs 活性. 细胞发生凋亡时, DNA-PKcs 在其中央区域 2712~ 2713 氨基酸残基处断裂, 使其活性丧失. 体外实验表明 DNA-PK 可磷酸化多种蛋白质底物, 包括 Ku、RPA、p53、c-myc、c-fos、Top I、Top II 以

及 RNA 聚合酶 II、pI、TF II D、Oct-1 等, 体内实验中除 RPA 证明是 DNA-PK 的底物外, 其他分子尚无直接证据.

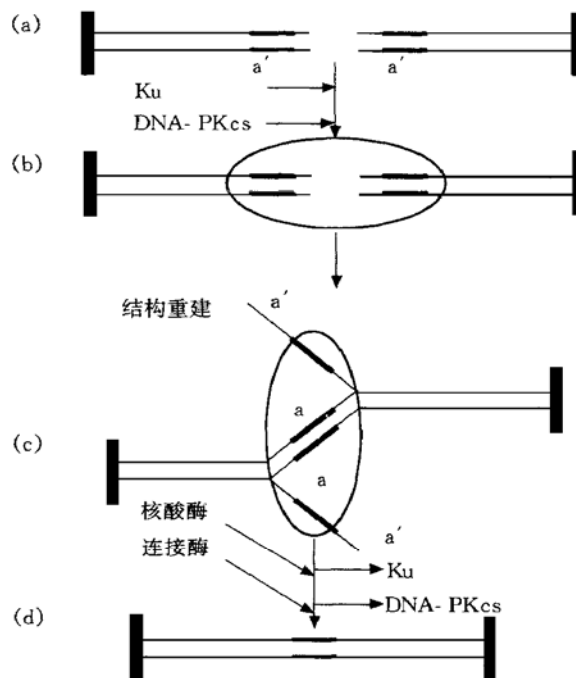


图 3 DNA-PK 参与 DNA 损伤修复机理

(a) DSB DNA 分子; (b) Ku 识别 DSB DNA 分子后激活 DNA-PKcs; (c) 在 DNA 损伤修复因子作用下, DSB DNA 进行结构重建, 完成 DNA 修复; (d) DNA 修复完成后 Ku 以及 DNA-PKcs 解离, 进行下一步反应.

细胞 DSB 修复缺陷导致电离辐射超敏感和免疫缺陷, 这两类看似无关的生物学过程通过 DSB 反应中间产物联系起来, DNA-PK DSB 修复功能集中体现在它参与免疫球蛋白和 TCR 基因的 V (D) J 重组上. V (D) J 重组由两步反应组成^[15]: 切割反应产生自由 DNA 末端, 末端连接反应使末端连接起来. 切割反应由编码区附近的重组信号序列 (RSS) 介导, RSS 由 7 个保守的 7 聚体组成, 其下游是 12 bp 或 23 bp 的间隔区和一个保守的 nonamer. RAG1 识别 RSS 上的 nonamer, 然后 RAG2 结合上来, 在 DNA 链上产生单链缺口, 随即受磷酸基团上 3'-OH 亲核攻击, 形成一个发夹编码末端和一个平端信号末端. 在体外, 在切割反应完成前有一个迟滞时间, Ku 蛋白就在此时结合到缺刻 DNA 上, 并吸引 DNA-PKcs 结合上来, DNA-PK 复合物的形成导致 Ku 的自身磷酸化, 激活其螺旋酶的活性. Ku 螺旋酶解开发夹编码末端使之有利于发夹外切酶的攻击, 发夹打开后, 由

TdT 酶促反应或非酶促反应实现 N 端添加. 如参与此过程中的蛋白质因子有功能障碍将导致

V (D) J 重组失败、细胞 DNA 损伤修复和抗体成熟受阻, 进而导致 IRs (表 1).

表 1 参与 V (D) J 重组的蛋白质因子

蛋白质因子	分子质量	突变细胞株	V (D) J 重组活性
断裂反应			
RAG1	119 000	基因敲除小鼠	断裂/发夹形成
RAG2	58 000	基因敲除小鼠	断裂/发夹形成
末端修饰			
发夹内切酶	?	?	P-核苷酸附加
TdT	58 000	基因敲除小鼠	N-核苷酸附加
末端连接反应			
XRCC4	37 000	XR-1	编码与信号连接
Ku80	86 000	xrs5, xrs6 sxi1, sxi2, sxi3	编码与信号连接
Ku70	70 000	基因敲除小鼠	
DNA-PKcs	465 000	scid 小鼠, V3, sx-9	信号连接

3 结 语

由于 DNA-PK 参与了 DNA 重组、修复、转录复制以及抗体形成, 使 DNA-PK 在多种细胞生物学过程中发挥着重要的作用, 而 a. 研究它在各种生理条件下的基因表达与调控; b. 对其各种顺式作用元件的克隆; c. 鉴定其相互作用的重要分子将有助于理解其多功能作用. 对 DNA-PK 的深入研究不仅有助于深刻了解辐射损伤的分子机理, 而且对认识多种自身免疫疾病提供有益的启示.

参 考 文 献

- 1 Yanold J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. *Radiother and Oncol*, 1997, **44**: 1~7
- 2 Griffith A J, Craff J, Evans J, *et al.* Neucleotide sequence and genomic structure analysis of the p70 subunit of the human Ku autoantigen: evidence for a family of genes encoding Ku70-related polypeptides. *Mol Biol Rep*, 1992, **16** (2): 91~97
- 3 Jacoby D B, Wensink P C. Yolk protein factor 1 is a *Drosophila* homolog of Ku, the DNA-binding subunit of a DNA-dependent protein kinase from humans. *J Biol Chem*, 1994, **269** (15): 11484~11491
- 4 Hong H, Qu Y, Nussenzweig A, *et al.* Ku70 is required for DNA repair but not for T cell receptor gene recombination. *J Exp Med*, 1997, **186** (6): 921~929
- 5 Koike M, Matsuda Y, Mimori T, *et al.* Chromosomal location of the mouse and rat DNA double strand break repair gene Ku70 and Ku80/XRCC5 and their mRNA expression in various mouse tissue. *Genomics*, 1996, **38**: 38~44
- 6 Zhu C, Bogue M A, Lim D S, *et al.* Ku86-deficient mice exhibit

severe combined immunodefective and defective processing of V (D) J recombination in termchafetes. *Cell*, 1996, **86** (3): 379~389

- 7 Osipovich O, Drmus K, Muegga K. Defining minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. *J Biol Chem*, 1997, **272** (43): 27259~27265
- 8 Cary R B, Peterson S R, Wang J. DNA-looping by Ku and DNA-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 4267~4272
- 9 Ghosh A K. Autoantigen Ku and its role in multiple cellular processes. *Indian J Exp Biol*, 1997, **35** (12): 1261~1272
- 10 Yoo S H, Dynan W S. Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. *Biochemistry*, 1998, **37** (5): 1336~1343
- 11 Tuteja N, Tuteja K, Ochem A, *et al.* Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J*, 1994, **13** (12): 4991
- 12 Fujimori A, Avaki R, Fukumura R, *et al.* The murine DNA-PKcs gene consists of 86 exons dispersed in more than 250 kb. *Genomics*, 1997, **45** (1): 194~199
- 13 Lee-Miller S P. The DNA-dependent protein kinase, DNA-PK: 10 years and no end in sight. *Biochem Cell Biol*, 1996, **74** (4): 503~512
- 14 Hammersten O, Chu G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (2): 525~532
- 15 Smider V, Chu G. The end-joining reaction in V (D) J recombination. *Immunology*, 1997, **45** (1): 194~199

Progress in DNA-dependent Protein Kinase. JIANG Guo-Chun, YUAN Li-Zhen (*Institute of Radiation Research, Academy of Military Medical Sciences,*

Beijing 100850, China).

Abstract DNA dependent protein kinase (DNA-PK) is a DNA ends binding protein composed of Ku protein and DNA-PKcs. Ku protein can bind directly to DNA ends, which will stimulate DNA-PK catalytic subunit. DNA-PK is a very important

cellular factor which plays important role in the multiple cellular processes such as DNA repair, gene recombination, DNA replication and transcription.

Key words DNA dependent protein kinase, Ku, DNA-PKcs, DNA repair

bcl-x 基因及其对细胞凋亡的调节

陈扬超 周克元

(广东医学院医用生物化学研究所, 湛江 524023)

摘要 bcl-x 是 bcl-2 家族中的重要成员, 由于不同的剪接产生 Bcl-X_L、Bcl-X_S、Bcl-X_V 三种同源蛋白. Bcl-X_L、Bcl-X_V 抑制凋亡, Bcl-X_S 促进凋亡. bcl-x 在细胞发育、维持机体平衡、肿瘤发生和预后中起作用. Bcl-X 通过与 Bcl-2、Bax、Bad 等相互作用而实现对凋亡的调控.

关键词 bcl-x 基因, Bcl-X 蛋白, 细胞凋亡, 调节
学科分类号 Q753

细胞凋亡受许多基因调节, 其中包括多种癌基因和抑癌基因如 *c-myc*、*bcl-2*、*p53*、*fas* 等. 其中 *bcl-2* 是与细胞凋亡关系最为密切, 被研究得最深入者之一. *bcl-2* 的表达产物位于线粒体内膜、核膜及内质网膜, 在人体多种肿瘤中高表达, 可抑制多种因素诱导的细胞凋亡^[1]. 进一步研究发现: *bcl-2* 是一个多基因家族, 包括多个成员. *bcl-x* 是近年发现的 *bcl-2* 家族成员之一^[2].

1 bcl-x 基因的克隆

1993 年 Boise^[2] 以鼠 *bcl-2* cDNA 为探针, 在鸡淋巴细胞 cDNA 文库中筛选到一个克隆, 命名为 *bcl-x*. 经 DNA 印迹等一系列实验证实其为与 *bcl-2* 显著不同的新基因. 随后用鸡 *bcl-x* cDNA 作探针, 筛选到人 *bcl-x* cDNA. 由于不同的剪接产生两种大小不同的 mRNAs: *bcl-x_L* (long form) 和 *bcl-x_S* (short form). *bcl-x_L* 类似于 *bcl-2*, 能抑制细胞凋亡, 奇怪的是, *bcl-x_S* 却能促进细胞凋亡.

2 bcl-x 基因组结构和 Bcl-x 蛋白质结构

鼠 *bcl-x* 基因位于 2 号染色体约 89 cM 处, 包含 3 个外显子, 外显子 I 不翻译. 剪接反应导致外显子 II 和外显子 III 连接构成 *bcl-x_L* 的编码区. 主要转录起始点位于外显子 I 上游一 GC 富含区, 外显

子 I 上游有多个 SP1 (stimulating protein 1) 结合特征结构 (motif). 在翻译起始密码上游 57 bp 处有一启动子. 这一结构与 *bcl-2* 极为相似, 提示 *bcl-x* 与 *bcl-2* 可能来源于同一祖先或是由基因重复产生. 在外显子 II 内 375 位选择性的剪接, 产生 *bcl-x_S* mRNA. 与 *bcl-x_L* 相比, *bcl-x_S* mRNA 缺少外显子 II 3' 端的 189 bp, 但二者都具有外显子 III 的序列^[3].

bcl-x_L 编码 241 个氨基酸, *bcl-x_S* 编码 178 个氨基酸, 与 *Bcl-X_L* 相比, 缺失的 63 个氨基酸均位于 *Bcl-2* 家族的高度同源区: BH1 (*Bcl-2* homology 1) 和 BH2 (*Bcl-2* homology 2) 内. 该区也是 *Bcl-2* 家族的高度保守区. *Bcl-X_L* 与 *Bcl-2* 氨基酸序列同源性为 43%^[2], 但 *Bcl-X_L* 与 *Bcl-2* 的 BH1 和 BH2 区同源性高达 73%. 由于缺少 BH1 和 BH2 区, 使得 *Bcl-X_S* 功能与 *Bcl-2* 和 *Bcl-X_L* 相反, 表明该区在 *Bcl-2* 和 *Bcl-X_L* 抑制细胞凋亡中有重要作用. 最近又分离到 *Bcl-x* 的又一同源蛋白 *Bcl-X_V* 其功能与 *Bcl-X_L* 相似, 抑制细胞凋亡^[4].

3 bcl-x 的转录与表达

免疫组化结果表明^[5], *bcl-x* 在许多组织细胞