

同源重组和重组酶 Rad51 的调控*

周化民¹⁾ 孙旭利¹⁾ 陈建明^{1,2)**}

⁽¹⁾ 厦门大学生命科学学院细胞应急生物学国家重点实验室, 厦门 361102;

⁽²⁾ 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要 同源重组是细胞非常重要的生命活动, 参与维持基因组的完整性与稳定性, 且与人类健康密切相关. 同源重组的研究不断取得进步. 本文讨论了同源重组的模式, 重组酶 RecA/Rad51 的作用机制以及 Rad51 调节蛋白对 Rad51 入核及 Rad51 参与重组过程中的单链结合、同源配对、入侵及链交换阶段的调控, 将有利于我们对同源重组的深入了解.

关键词 同源重组, RecA, Rad51, Rad51 调节蛋白, 调节

学科分类号 Q51, Q341

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0171

同源重组(homologous recombination, HR)是指同源染色体或姊妹染色单体间遗传信息的交换. 在减数分裂期间同源重组导致来自两亲本的同源染色体等位基因发生交换, 增强了子代的遗传多样性. 同时, 其还保证了同源染色体的正确分离. 在体细胞有丝分裂中, 同源重组使双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)及链间交联 DNA 和损坏的复制叉得以修复, 确保 DNA 的复制; 同源重组也能恢复缺损的端粒, 维持基因组的稳定性^[1-2]. DNA 损伤虽然也可通过非同源 DNA 末端连接(non-homologous DNA end-joining)方式修复, 但其修复的有效性及精确性较低. 同源重组修复占据 DNA 修复的核心地位, 是一个复杂的生物化学反应过程, 受多种因子的调控. 本文对同源重组、重组酶 Rad51 及某些蛋白调节 Rad51 参与的反应作简要综述.

1 同源重组的基本过程

现在已经清楚了同源重组的基本过程. 在减数分裂中, 同源重组可能采用双链断裂修复模式(double-strand break-repair, DSBR), 在此过程中, DNA 双链断裂刺激同源重组起始. 人 MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)复合物首先结合到 DNA 双链断裂端, 接着核酸酶 CtIP 被 CDK 磷酸

化后也结合到断裂端, 刺激 5'→3'方向 DNA 链加工, MRN 和 CtIP 合作, 产生 50~100 核苷酸的 3'-OH 突出单链 DNA(single strand DNA, ssDNA)^[2-3]. ATM 刺激 CtIP 和 MRE11 活性, 促进 3'-OH 突出 ssDNA 形成^[4]. 此后由 EXO1(5'→3'exonuclease)和 BLM(helicase)-DNA2 催化产生必要长度的 3'-OH 突出 ssDNA, 重组酶 RecA/Rad51 在 ssDNA 上形成螺旋状纤维丝, 并引导 DNA 单链侵入同源双链中, 形成 D 环(displacement loop, D-loop), 在 D 环内, DNA 聚合酶以同源互补 DNA 链为模板, 在 3'-OH 上合成 DNA. 双链断裂的第二个 3'-OH 突出 ssDNA, 通过退火被 D 环捕获, DNA 合成、延伸, 形成 2 个 Holliday 结构. 最后, 该结构被 BLM-TOP3 α -RMI1/2(TOP3 α :type I A DNA topoisomerases; Rmi1:OB-fold protein)解离酶(resolvase)或其他核酸酶 hMUS81-EME1 和 GEN1 分离^[2,5], 重组完成(图 1a). 在有丝分裂中, 同源重组可能采取合成依赖的链的退火修复模式(synthesis-dependent strand annealing, SDSA), 也就是双链断裂的第二个

* 细胞应激生物学国家重点实验室开放课题(SKLCBS2016KF003).

** 通讯联系人.

Tel: 0592-2187921, E-mail: chenjm@xmu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-25, 接受日期: 2016-10-27

3'-OH 突出 ssDNA, 并不被 D 环捕获, 而是双链断裂的第一个 3'-OH 突出 ssDNA 在 D 环内延伸后, 在 Topo3 α -RMI1/2 作用下退出 D 环^[9], 与双链断裂的第二个 3'-OH 突出 ssDNA 退火, 使该第二个 3'-OH 单链重新获得模板而延伸, 完成 DNA 双链断裂修复(图 1b)^[1]. 带有单链断裂的 DNA, 以断裂单链为模板复制 DNA 时, 在断裂部位会产生仅有一个 DNA 双链断裂端, 断裂单链的另一端和以其互补链为模板合成的 DNA 新链连接形成完整双

链, 这样的单一双链断裂端也能诱导复制(break-induced replication, BIR). 断裂端水解后入侵同源或姊妹染色单体双链内, 复制 DNA 遗传信息, 形成的 Holliday 结构解离后, 完成复制叉修复(图 1c)^[6]. 如果双链断裂发生在端粒内, 末端部分因太短而丢失, 这样仅存一个断裂端, 形成单链后, 入侵同源或姊妹染色单体双链内, 复制部分端粒 DNA 序列, 这部分 DNA 经滚环(rolling-loop)复制, 生成完整甚至更长一点的端粒(图 1d)^[7].

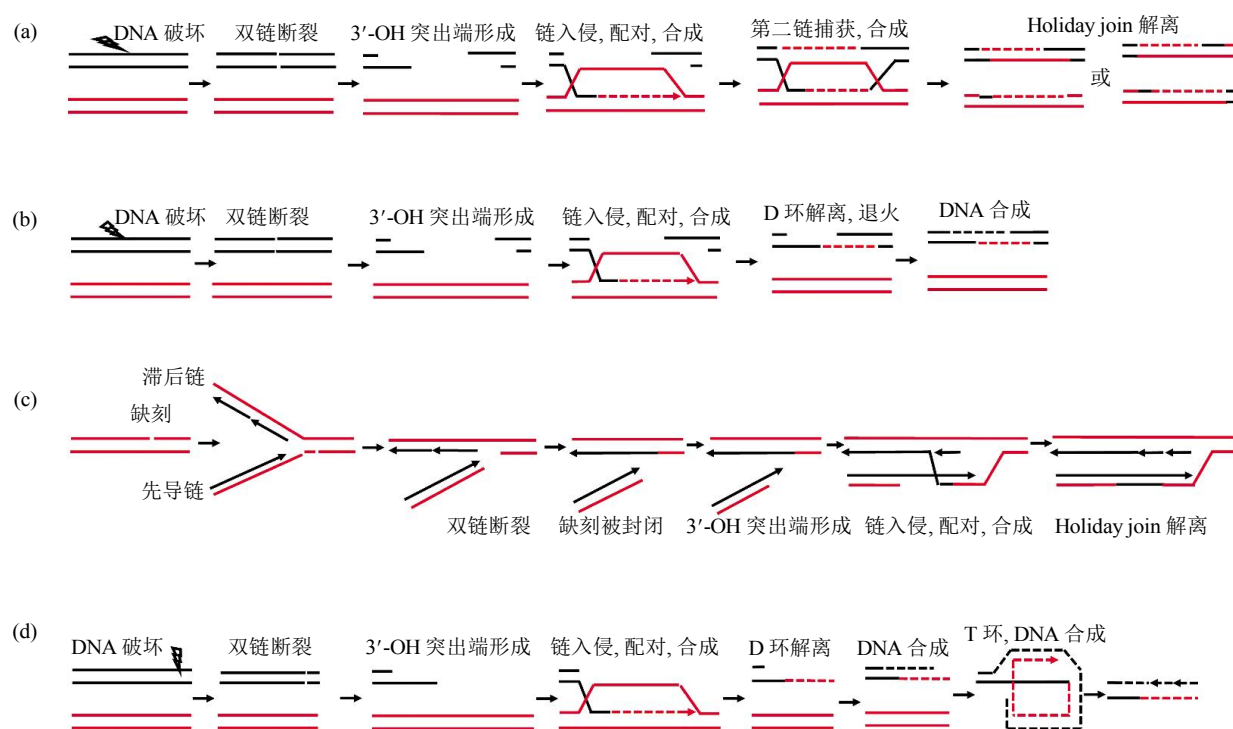


Fig. 1 Pathways of DNA double-strand break repair by homologous recombination

图 1 DNA 双链断裂同源重组修复模式

(a) 双链断裂修复模式(DSBR). (b) 合成依赖的链的退火修复模式(SDSA). (c) 单一双链断裂端诱导复制(BIR)修复复制叉. (d) 单一双链断裂端诱导复制修复端粒.

还有其他类型的重组, 如双链断裂部位两侧有直接重复序列, 直接重复序列单链可以相互退火(single-strand annealing, SSA). 但它们可能并不需要 Rad51 的参与, 因此不在此累述.

2 RecA/Rad51 重组酶

同源重组反应中最重要的是单链入侵、同源配对及链交换阶段, 催化这一阶段的酶称重组酶, 即 RecA/Rad51 家族蛋白. 从原核到人, 这一家族蛋白结构和功能都是非常保守的^[8]. 在人类, Rad51

有 1 个直系同源蛋白(partholog)Dcm1, 5 个旁系同源蛋白(paralog)Rad51B、Rad51C、Rad51D、Xrcc2 和 Xrcc3. 酵母 Rad51 旁系同源蛋白 Rad54、Rad55、Rad57. Dcm1 主要在减数分裂同源重组中发挥 Rad51 样功能, 旁系同源蛋白参与调节 Rad51 介导的同源重组过程. 目前, 对同源重组过程核心蛋白 Rad51 的研究比较详细, 也在减数分裂同源重组中发挥作用, 因此是我们综述的重点.

现在一般认为, RecA/Rad51 装配在 ssDNA 上, 形成右手螺旋纤维. 这个 RecA/Rad51-ssDNA

结构为前联会纤维(presynaptic filament), 它通过随机碰撞或某些因子的协助, 捕获双链 DNA(double strand DNA, dsDNA)分子结合于前联会纤维外侧第二 DNA 接合位点, Rad51-ssDNA 同源搜寻时, ssDNA 和 dsDNA 之间至少需要 8 个连续的互补核苷酸, 达到 15 个时, 则结合比较稳定. 第 9 个以后的核苷酸结合, 自由能的减少以所谓的核苷酸三联体的方式进行^[9]. 前联会纤维与非同源的 DNA 结合是不稳定的, 迅速被释放, 如此反复, 搜索直到发现同源序列^[10]. 在此处, dsDNA 与前联会纤维大致是平行的, dsDNA 分子与纤维中单链碱基配对(主要是 A-T 配对)^[11], 但并不像双链 DNA 那样相互环绕, 前联会纤维吸收 dsDNA 组成的结构称联会纤维(synaptic filament), 这样的联会纤维结构可在前联会纤维上多个位点出现, 联会纤维因此并不连续. 前联会纤维和 dsDNA 转动, 前联会纤维和 dsDNA 形成缠绕, 紧接着伴随 ATP 水解, 单链和双链中的互补链配对并相互环绕, 沿 5'→3'方向, 另一条链被替换出来, 及所谓分支点迁徙, 形成 D 环结构. 如此形成的杂合 DNA 双链可长达几千碱基对. HDHB(human DNA helicase B)能推动杂合 DNA 的延伸^[12]. ATP 水解导致 5'端的 RecA/Rad51 解聚, 使有足够的自由 RecA/Rad51 在 3'装配成前联会纤维, 有助于 DNA 链的配对与交换^[13]; 联会纤维内 dsDNA 结构松散也有助于 DNA 链的配对与交换, DNA 的配对和链的交换过程也是同源性检验的过程^[14]. 显然, Rad51 表达越高, DNA 同源性长度(一般大于 500 bp)越长, D 环内 ssDNA 3'-OH 延伸合成的频率就越高^[15].

一些蛋白具有抗重组酶活性, 抑制不适当的同源重组, 如 Srs2、RTEL (regulator of telomere length)、PARI、FBH1 和 RECQL5(helicase). Srs2 是 SF-1 (superfamily-1)螺旋酶/转位酶家族蛋白, 它的 C 端结构域(约 400 个氨基酸)和 Rad51 物理方式相互作用, 刺激 Rad51 的 ATPase 活性, ATP 水解导致 Rad51 丧失 DNA 结合能力, 抑制同源重组^[16]. FBH1 (F-box DNA helicase 1)也是螺旋酶, Swi5-Sfr1 激活前联会纤维, FBH1 破坏它, 因此在 Swi5-Sfr1 缺乏时, 前联会纤维的破坏抑制链交换反应, 而当链交换反应开始后, 由 FBH1-SKP1 刺激该反应, 与它的螺旋酶活性无关. 另外在细胞静息期, FBH1 是 E3 连接酶 SCF^{Fbh1} 复合物 SCF (SKP1-CUL1-FBH1)的组分, 沿着 DNA 链运动, 结合 Rad51, 导致 Rad51 被 SCF 在 K58/64 位点泛

素化, 不能再与 DNA 结合, 确保功能性的 Rad51 纤维在 DNA 损伤位点形成, 去除意外结合在 ssDNA 上的 Rad51, 抑制不恰当的同源重组^[17-18]; Swi5-Sfr1 复合物是染色质重塑者, 通过 Sfr1 的 C 端结构域与 Rad51 纤维相互作用, 而不是与 DNA 相互作用, 使 ssDNA 的碱基排列更垂直于纤维轴, 反之碱基随机定向, 垂直定向便于单链入侵与链交换^[19-20]; BRG1 是 Swi/Snf ATPase 亚单位, 和 Rad52 相互作用, BRG1-Rad52 复合物促进 RAD51 替换 ssDNA 上的 RPA, 启动单链入侵^[21].

3 BRCA2 对 Rad51 的调节

人的 BRCA2 有 3 418 个氨基酸, 中部有 8 个重复结构(BRC repeat), 除去 5 和 6 外, 其余的 6 个重复都能和单体形式的 Rad51 相互作用, 但是亲和程度不等^[22-24]. 但令人惊讶的是, BRC5~8 区段比 BRC1~4 区段更有效地稳定 Rad51 纤维, 推动重组修复^[25]. BRC Repeat 通过模块(BRC4 为 FHTA)与介导 Rad51 单体聚合肽段(FTTA)相互作用^[23], 形成 BRC repeat 与 Rad51 相互间隔的结构, 或 Rad51 只剩下另一个界面与下一个 Rad51 分子聚合. 活细胞成像技术也显示, 核 BRCA2 寡聚化, BRCA2 和 Rad51 有相似的扩散行为, 提示它们之间有物理相互作用^[26]. David 甚至报告在 HU 处理导致 DNA 复制停滞时, 就是和 BRCA2 结合的 Rad51 参与了重组修复^[27]. BRCA2 也能与前联会纤维作用而不破坏纤维结构. BRCA2 的 N 端和 RPA 相互作用. BRCA2 的 C 端区域 (C-terminal region of BRCA2, CTRB)能和寡聚化的 Rad51 相互作用, 结合在 Rad51 两单体间的界面处, 且 CDK(cyclin A-CDK2)磷酸化 S3291, 能破坏这一相互作用, 而 Cyclin D1 促进 BRCA2-Rad51 相互作用, 阻碍该位点的磷酸化^[28-29]. 在 BRCA2 近 C 端由 5 个亚域(OB1/2/3、Tower domain 和 Helical domain)构成 DNA 结合结构域. 包埋在 helical domain 和 OB1 间的界面介导 BRCA2 和 DSS1 的相互作用. DSS1 是一个内部无结构的多功能小蛋白, 存在于多个复合体中. DSS1 直接与 RPA70 亚基的碱性区域相互作用, 使得 DSS1-BRCA2 靶向 RPA, DSS1 模仿 ssDNA, 和 ssDNA 竞争与 RPA 的 OB1/2 相互作用, 减弱 RPA 和 ssDNA 的结合, 允许 Rad51 替换 RPA^[30-31]. 概括地说, BRCA2 的每个 BRC repeat 和 Rad51 结合, 而 CTRB 结合寡聚化 Rad51, BRCA2 通过 CTD DNA 结合活性及

BRCA2 与 DSS1 相互作用, 吸引 BRCA2 结合到双链 - 单链连接处的 ssDNA (非 dsDNA) 上, 促进 Rad51 结合 ssDNA (所谓 Rad51 在 ssDNA 上形成晶核(nucleation))^[32-34]. 通过与 DSS1 与 RPA 相互作用

用, Rad51 替换 RPA, 推动 Rad51 在 ssDNA 上装配成前联会纤维(图 2). 使用纯化的全长 BRCA2, 也显示 DSS1 推动 Rad51 在 ssDNA 的装配^[35-37].

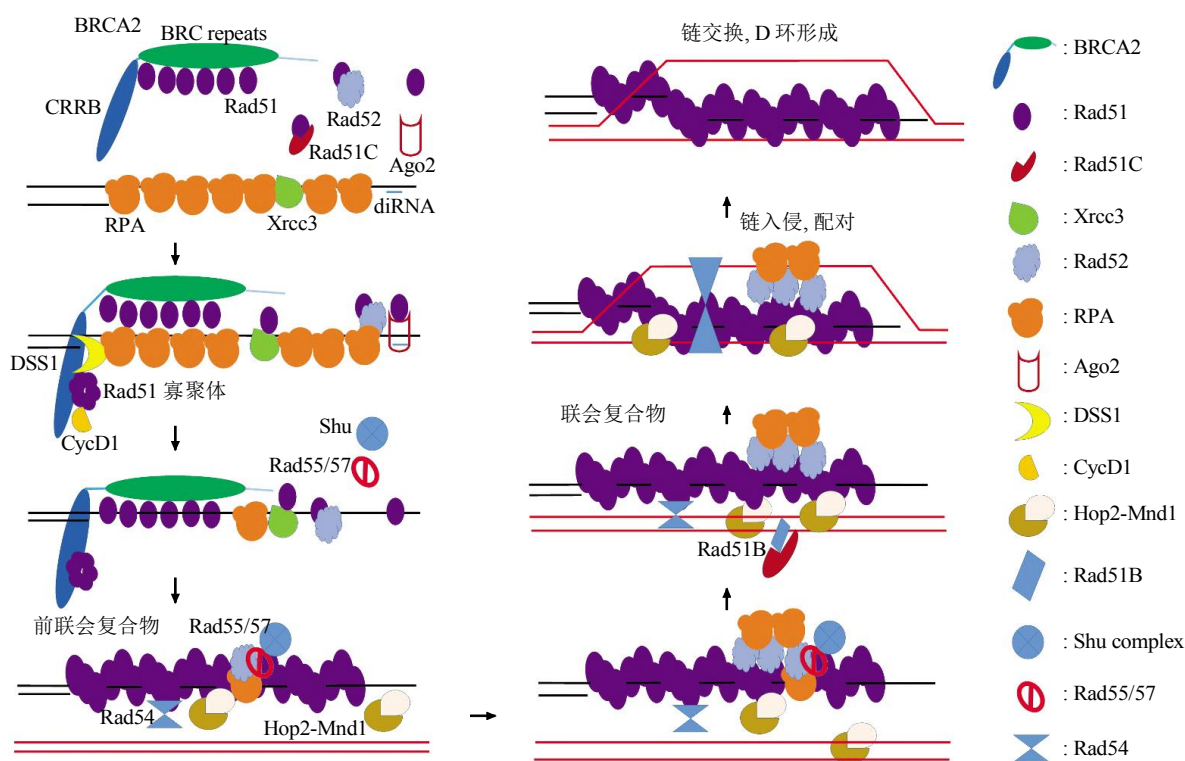


Fig. 2 Both BRCA2 and Rad51 paralogs and their roles as HR mediators

图 2 BRCA2 和 Rad51 同源蛋白对 Rad51 的调节

Jeyasekharan 等^[38]报告 DSS1 结合在 BRCA2 上, 覆盖了 BRCA2 的出核信号, 在 BRCA2 的 C 端有入核信号, 所以 BRCA2-DSS1 可以入核. Rad51 和 BRCA2 的 BRC repeat 相互作用, 掩盖了 Rad51 的出核信号. Rad51 寡聚体分子质量较大, 不能入核, 单体可以入核, 并和 BRCA2 结合, BRCA2 封闭了 Rad51 的出核信号, Rad51 被滞留在核内. Rad51C 也可帮助 Rad51 入核^[39]. 而 hCAS/CSEIL 能直接与 Rad51 相互作用, 负调节 Rad51 核质水平^[40].

其他分子如 PALB2 通过 Rad51C 和 BRCA2 相互作用, 形成 PALB2-Rad51C-BRCA2-Rad51 复合物而作用于 Rad51, 进而调节细胞的同源重组过程^[41]. PALB2 WD40 domain 突变, 将导致乳腺癌.

4 p53 与 Rad51

p53 有双重功能, DNA 损伤较轻, 促进重组,

损伤严重时抑制重组, 导致凋亡. p53 与 Rad51 启动子及 Rad51 蛋白相互作用下调 Rad51 表达, 抑制 Rad51 装配, 抑制重组^[42]. Esashi 等^[29]报告说, 放射性处理导致 CDK 介导的 BRCA2 羧基端 S3291 磷酸化降低, 低磷酸化的 BRCA2 和 Rad51 相互作用, 刺激重组. 信号传导的过程为 DNA 损伤激活 ATM, ATM 下游信号分两条线: 一路 ATM 把信号传递给 p53, 导致 p21 转录激活, p21 抑制 CDK 的激酶活性(cyclin A-CDK2); 另一路 ATM 磷酸化激活 CHK2, CHK2 磷酸化 CDC25, CDC25 降解或囚禁于胞质, 失去 CDC25 磷酸化激活 CDK 活性部位. 两条线最终都导致 CDK 降低 BRCA2 羧基端 S3291 磷酸化, 细胞重组修复辐射断裂的 DNA. 也有研究显示 Rad51 过表达促进 p21 的表达(并非通过 p53 途径), 保护细胞免于凋亡.

p53 能与 Rad51 相互作用, 抑制重组^[43], 病毒 HCMV 蛋白 IE72 和 p53 也相互作用. 在正常 HEF

细胞被 HCMV 感染, IE72 和 p53 也相互作用, 使得和 p53 相互作用的 Rad51 被释放, 呈现病毒刺激重组现象. 而在 T98G 细胞, 突变的 p53 不和 Rad51 作用, IE72 和 Rad51 作用, 重组被抑制^[44].

5 Rad51 同源蛋白对 Rad51 的调节

Rad51 有多个旁系同源蛋白(paralogue), 它们对 Rad51 有调节作用(图 2)^[1-2, 45]. Rad51C 可能保护 Rad51 免于泛素化, 因为 DNA 修复结束后, Rad51 可被泛素化降解^[46]. Xrcc3 先定位在 ssDNA 上, Rad51 通过和 Xrcc3 相互作用, 吸引自由 Rad51 到 ssDNA 上, 同时 Xrcc3 替换 Rad51C, 以这样的方式 Rad51 结合到 ssDNA 上, 这一过程可能发生在同源重组过程的早期(图 2). BRCA2-Rad51 中的 Rad51 可能较晚才结合到 ssDNA 上^[47].

Rad51B/C 复合物也有 DNA 结合能力, Rad51C 促进双链 DNA 熔解, 推动 Rad51 介导的链配对(图 2), BCDX2(Rad51/B/C/D, XRCC2), CX3(Rad51C, XRCC3)复合物影响前联会纤维的装配与稳定性. 但它们可能参与不同情形下的 DNA 修复, BCDX2 与 IR 诱导的双链断裂修复有关, 而 CX3 则通过解聚 Rad51 纤维(保护刚合成的 DNA 免于被 Mre11 降解)在 HU 诱导的复制叉停滞重启中发挥作用^[48].

Rad55/57 形成稳定的复合物, 有与 ssDNA 及 Rad51 的结合能力, 帮助 Rad51 定位到 ssDNA 上, 克服 RPA 的抑制; Rad55/57 也抑制 Srs2 的活性, 解除 Srs2 对 Rad51 纤维形成的抑制, 推动 Rad51 纤维形成^[49]; Shu 复合物(酵母为 Shu1/2-Csm2-Psy3; 人为 SWS1-SWSAP1)中的 Shu2/SWS1 也是 Rad51 旁系同源物. Csm2 和 Rad51 与 Rad55-Rad57 都能相互作用, 但 Csm2 和 Rad51 的作用依赖于 Rad55, 而和 Rad55 的作用独立于 Rad51, 即 Rad55 桥联 Csm2 和 Rad51. Shu 复合物通过 Csm2-Psy3 被募集到重组位点 ssDNA 上, 通过 Rad55-Rad57 与 Rad51 相互作用, Rad55-Rad57 与 Rad52 相互作用, 促进 Rad51 纤维组装与稳定, 推动同源重组^[50](图 2). PCNA (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)形成同源三聚体, 像滑动的环锚定在 DNA 上. 当无 DNA 损伤时 PCNA 被小泛素样分子(SUMO)修饰, 募集 Srs2, 抑制同源重组; 在 DNA 损伤位点, PCNA 被 Rad5-Ubc13-Mms2 E2-E3 复合物在 K63 多泛素化修饰后(K164

被 Rad6-Rad18 单泛素化后), 推动 TLS (translesion DNA synthesis), 募集 Shu 复合物, 然后 Rad55-Rad57 通过 Csm2-Rad55 相互作用, 推动 Rad51 在新合成的 DNA 链上形成 Rad51-ssDNA 纤维. Rad51-ssDNA 纤维以 HR 的方式, 进行链的入侵而切换模板, 以姊妹染色单体为模板合成 DNA, 绕过了原模板损伤部位后, 再以原模板进行复制^[51]. 线虫 Shu 复合物 (SWS-1- RIP-1 RFS-1)能减少 Rad51 从 ssDNA 解离, 是 Rad51-ssDNA 纤维采取更开放的构象, 使其他蛋白易于接近, 促进同源搜索与链交换^[52-53].

酵母 Rad52 的 N 端结构域使它能形成环状寡聚化, 11 亚单位构成的环, 深槽内分布碱性和芳香性氨基酸, 能与 ssDNA 结合^[54]; 中部与异源三聚体的 RPA 大中亚基相互作用; 而 C 端与 Rad51 相互作用. 这样 3'-OH 突出 ssDNA 一旦形成, 即和 RPA 结合, 结合的 RPA 和自由的 RPA 可以相互交换, Rad52 和 RPA 相互作用, 抑制了 RPA 的交换. Rad52 和 Rad51 相互作用, 把 Rad51 募集到 ssDNA 上, Rad51 替换 Rad52 和 RPA, Rad51 和 ssDNA 形成前联会纤维, 在 ssDNA 有些位点, Rad52 没有把 Rad51 募集到 ssDNA 上, 仍然是 Rad52-RPA-ssDNA 结构, 即前联会纤维被 Rad52-RPA-ssDNA 中断, 在此位点, Rad52 通过和 Rad51 相互作用, 在前联会纤维之上形成 Rad52 链, RPA 再结合到这样的 Rad52 上, 形成 RPA 链. Rad52-RPA 链可以帮助 ssDNA 入侵, 稳定被前联会纤维替换出来的双链 DNA 中的非互补单链, 也有利于双链断裂第二链的捕获与退火^[55-56](图 2). 不过, 人 Rad52 更多的是辅助其他因子执行重组调节活性.

核小体通过 H1 组蛋白形成高度有序的结构. Nap1 家族蛋白是组蛋白分子伴侣, 当它和 Rad54 相互作用时, 逐出 H1, 刺激 Rad54 介导的核小体重塑. 从而促进 Rad51/Rad54 介导的同源重组^[57]. Rad54 的 N 端有 ssDNA 结合位点, C 端有 dsDNA 结合位点. Rad54 和 ssDNA 上的 Rad51 相互作用时, 形成 Rad54-Rad51-ssDNA 结构, 单链入侵时, Rad54 捕获 dsDNA, 并结合在它的 dsDNA 结合位点, 形成 dsDNA-Rad54-Rad51-ssDNA 联会结构. dsDNA 分离, 一条链与 ssDNA 互补, 形成异源双链 DNA, 另外一条非互补链结合到 Rad54 的 ssDNA 结合位点. Rad54 双链依赖的 ATP 酶活性, 推动 Rad54 从 ssDNA 末端沿 3'→5'方向运动或从

内部沿 3'→5' 方向运动, 形成 D 环结构^[58](图 2). 另一方面, Rad54 去除双链 DNA 上的 Rad51, 防止 Rad51 与 dsDNA 非特异性结合, 而造成的基因组不稳定^[59].

6 其他蛋白对 Rad51 的调节

HOP2-MND1 形成异源二聚体, 与 Rad51 相互作用, 诱导 Rad51 构象的变化, 影响它的特性, 如即使在高 ADP 条件下, Rad51-ssDNA 纤维的稳定性以及优先结合 ssDNA, 而在同源搜索时优先结合 dsDNA, 防止非同源 ssDNA 的结合等^[60]. HOP2-MND1 两者的 C 端不同区域与 ssDNA 及 Rad51 相互作用, 通过与 ssDNA 的作用, 稳定 Rad51-ssDNA 前联会纤维, N 端有 dsDNA 结合特性诱导, 可结合 dsDNA 促进同源搜索. 加速联会纤维及 D 环形成^[61](图 2).

DSB 位点处可能发生双向转录, 产生双链 RNA, 经 Ago2/Dicer 加工后, 产生 diRNA(DSB-induced small RNAs), 它和 Argonaute(Ago2)相关联, Ago2 和 Rad51 相互作用形成复合物, 通过 diRNA 与 DSB 处 DNA 互补, 促进 Rad51 募集到 ssDNA 上^[62-63](图 2). GEMIN2, 一个和拼接小体生物发生相关的蛋白, 能和 Rad51 直接相互作用, 抑制 Rad51-ssDNA 的分离, 推动 Rad51 在 ssDNA 上的装配^[64].

CAF-1 (chromatin assembly factor 1) 是组蛋白 H3-H4 分子伴侣, CAF-1 通过拮抗 RecQ helicase Rqh1(BLM 同源物)依赖的 D 环解体, 推动 Rad51 介导的损伤 DNA 复制时的模板切换, 当 CAF-1 行驶分子伴侣功能时, 推动组蛋白聚集在 D 环新合成的 DNA 上, 形成核小体, 它不是 Rqh1 的合适底物, 或靶向 D 环上的 PCNA, 通过与 Rqh1 相互作用, 干扰它的功能, 从而抑制 Rqh1 的 D 环解聚活性^[65].

7 结 语

同源重组是细胞重要的生命活动, 对维持基因组的完整性与稳定性非常重要, 体细胞面对复杂的内外环境, DNA 受损是常见的, 因此有丝分裂时需要重组修复断裂的 DNA, 以完成 DNA 的复制和细胞正常分裂. 减数分裂时, 同源重组导致子代基因型的更大的多样性. 近年来, 发现 Rad51 调节蛋白如 BRCA2 突变影响 Rad51 活性, 导致癌症, Rad51 过表达就能克服 BRCA2 缺失对同源重组的

影响^[66-67]. 而 Rad51T131P 突变呈现 FA 样症状^[68], FA 蛋白可能通过 Brca2/PALB2 影响同源重组过程, 使人们对 Brca2 和 Rad51 间的关系产生了极大的兴趣, 取得了丰硕的成果. 但过度重组则适得其反, 癌细胞会对抗癌药物产生抗药性^[69-70]. 由此激发许多 Rad51 直接或间接抑制剂的研究以提高抗癌放疗或药物的效果^[71]. 另外, miRNA 如 MiR-506 通过靶向 Rad51 抑制同源重组增强化疗药物的敏感性^[72]. 可见同源重组与人类疾病关系密切且复杂. 同源重组的研究长期以来一直被人们所关注, 已使我们对此有了较深入而全面的了解, 但对人类相关蛋白的研究仍然是有限的, 比较多地集中在癌基因 Brca2、抑癌基因 p53 及旁系同源蛋白对 Rad51 的调节. 最近也发现新的蛋白如 Ago2、GEMIN2 和 CAF-1 对 Rad51 功能的调节, 但对于如 CX3 和 Shu 复合物对 Rad51 的功能调节, 以及在特定细胞条件下, 细胞如何选择相应的调节蛋白组成通路, 各通路如何协调等缺乏深入的了解. 可以肯定, 使用更丰富的实验手段将揭示更多的人类蛋白参与调节 Rad51 活性, 蛋白质翻译后修饰如磷酸化、SUMO 化、泛素化或许扮演更多的调节角色, 也可能显示 DNA 代谢的各个方面如其他类型的修复、复制与转录都与同源重组相关. 无疑对同源重组的深入研究, 一定有益于人类健康.

大肠杆菌 RecA 基因是人 Rad51 基因的直系同源基因, 是非常保守的, 而从现已测得的原核生物 RecA 间、单核真核生物中 Rad51 间及高等真核生物 Rad51 间序列更为保守. 大肠杆菌 RecA 表达在 HeLa 细胞细胞质中不能进入细胞核, 人 Rad51 蛋白必须在细胞核中发挥作用, 可能 RecA/Rad51 从低等的大肠杆菌到高等的哺乳动物进化过程中, RecA 通过突变使其由细胞质转移到细胞核, 或者通过 Brca2/DSS1 机制滞留在核中^[38], 尽管 Rad51 的出核信号序列还没有测定. 可能生命早期 RecA/Rad51 首先是获得基本的入核条件, 此后为了适应真核生物复杂生命活动的需要, 才有附加机制保持其核定位, 这也可能意味着这一家族蛋白从低等向高等进化中, 除解决入核这一基本问题外, 更多的变化可能是为该分子适应高等生物细胞复杂生命活动提供调节其活性的位点, 而这些调节在原核生物中是不需要的.

参 考 文 献

- [1] San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic

- homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 2008, **77**: 229–257
- [2] Kowalczykowski S C. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, **7**(11): 1–36
- [3] Godin S K, Sullivan M R, Bernstein K A. Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem Cell Biol*, 2016, **95**(5): 407–418
- [4] Bakr A, Oing C, Kücher S, *et al.* Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(6): 3154–3166
- [5] Fasching C L, Cejka P, Kowalczykowski S C, *et al.* Top3-Rmi1 dissolve Rad51-mediated D loops by a topoisomerase-based mechanism. *Mol Cell*, 2015, **57**(4): 595–606
- [6] Mariani K J. PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**(4): 185–189
- [7] McEachern M J, Haber J E. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem*, 2006, **75**: 111–135
- [8] Lusetti S L, Cox M M. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**: 71–100
- [9] Qi Z, Redding S, Lee J Y, *et al.* DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination. *Cell*, 2015, **160**(5): 856–869
- [10] De Vlaminck I, van Loenhout M T, Zweifel L, *et al.* Mechanism of homology recognition in DNA recombination from dual-molecule experiments. *Molecular Cell*, 2012, **46**(5): 616–624
- [11] Gupta R C, Foltá-Stogniew E, O'Malley S, *et al.* Rapid exchange of A: T base pairs is essential for recognition of dna homology by human rad51 recombination protein. *Molecular Cell*, 1999, **4**(5): 705–714
- [12] Liu H, Yan P, Fanning E. Human DNA helicase B functions in cellular homologous recombination and stimulates Rad51-mediated 5'-3' heteroduplex extension *in vitro*. *PLoS One*, 2015, **10** (1): e0116852
- [13] Forget A L, Loftus M, McGrew D, *et al.* The human Rad51 K133A mutant is functional for DNA double-strand break repair in human cells. *Biochemistry*, 2007, **46**(11): 3566–3575
- [14] Bazemore L R, Foltá-Stogniew E, Takahashi M, *et al.* RecA tests homology at both pairing and strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(22): 11863–11868
- [15] Mundia M M, Desai V, Magwood A C, *et al.* Nascent DNA synthesis during homologous recombination is synergistically promoted by the rad51 recombinase and DNA homology. *Genetics*, 2014, **197**(1): 107–119
- [16] Lytle A K, Origanti S S, Qiu Y, *et al.* Context-dependent remodeling of Rad51-DNA complexes by Srs2 is mediated by a specific protein-protein interaction. *J Mol Biol* 2014, **426** (9): 1883–1897
- [17] Tsutsui Y, Kurokawa Y, Ito K, *et al.* Multiple regulation of Rad51-mediated homologous recombination by fission yeast Fbh1. *PLoS Genet*, 2014, **10**(8): e1004542
- [18] Chu W K, Payne M J, Beli P, *et al.* FBH1 influences DNA replication fork stability and homologous recombination through ubiquitylation of RAD51. *Nat Commun*, 2015, **6**: 6931
- [19] Fornander L H, Renodon-Cornière A, Kuwabara N, *et al.* Swi5-Sfr1 protein stimulates Rad51-mediated DNA strand exchange reaction through organization of DNA bases in the presynaptic filament. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(4): 2358–2365
- [20] Su G C, Yeh H Y, Lin S W, *et al.* Role of the RAD51-SWI5-SFR1 Ensemble in homologous recombination. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(13): 6242–6251
- [21] Qi W, Wang R, Chen H, *et al.* BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitating the replacement of RPA with RAD51. *J Cell Sci*, 2015, **128**(2): 317–330
- [22] Pellegrini L, Yu D S, Lo T, *et al.* Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 2002, **420**(6913): 287–293
- [23] Rajendra E, Venkitaraman A R. Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(1): 82–96
- [24] Shivji M K, Davies O R, Savill J M, *et al.* A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (14): 4000–4011
- [25] Scott D E, Marsh M, Blundell T L, *et al.* Structure-activity relationship of the peptide binding-motif mediating the BRCA2: RAD51 protein-protein interaction. *FEBS Lett*, 2016, **590** (8): 1094–1102
- [26] Reuter M, Zelensky A, Smal I, *et al.* BRCA2 diffuses as oligomeric clusters with RAD51 and changes mobility after DNA damage in live cells. *J Cell Biol*, 2014, **207**(5): 599–613
- [27] Yu D S, Sonoda E, Takeda S, *et al.* Dynamic control of rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Molecular Cell*, 2003, **12**(2): 1029–1041
- [28] Chalermrujanant C, Michowski W, Sittithumcharee G, *et al.* Cyclin D1 promotes BRCA2-Rad51 interaction by restricting cyclin A/B-dependent BRCA2 phosphorylation. *Oncogene*, 2015, **35**(22): 2815–2823
- [29] Esashi F, Christ N, Gannon J, *et al.* CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 2005, **434**(7033): 598–604
- [30] Zhao W, Vaithiyalingam S, San Filippo J, *et al.* Promotion of BRCA2-dependent homologous recombination by DSS1 *via* RPA targeting and DNA mimicry. *Molecular Cell*, 2015, **59**(2): 176–187
- [31] Gudmundsdottir K, Lord C J, Witt E, *et al.* DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep*, 2004, **5**(10): 989–993
- [32] Yang H, Li Q, Fan J, *et al.* The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature*, 2005, **433**(7026): 653–657
- [33] Carreira A, Hilario J, Amitani I, *et al.* The BRC repeats of BRCA2

- modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell*, 2009, **136**(6): 1032–1043
- [34] Shivji M K, Mukund S R, Rajendra E, *et al.* The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single-versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(32): 13254–13259
- [35] Jensen R B, Carreira A, Kowalczykowski S C. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 2010, **467**(7316): 678–683
- [36] Liu J, Doty T, Gibson B, *et al.* Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(10): 1260–1262
- [37] Thorslund T, McIlwraith M J, Compton S A, *et al.* The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(10): 1263–1265
- [38] Jeyasekharan A D, Liu Y, Hattori H, *et al.* A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(10): 1191–1198
- [39] Gildemeister O S, Sage J M, Knight K L. Cellular redistribution of Rad51 in response to DNA damage : novel role for Rad51C. *J Biol Chem*, 2009, **284**(46): 31945–31952
- [40] Okimoto S, Sun J, Fukuto A, *et al.* hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes Cells*, 2015, **20**(9): 681–694
- [41] Park J Y, Singh T R, Nassar N, *et al.* Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 2014, **33**(40): 4803–4812
- [42] Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, *et al.* p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep*, 2006, **7**(2): 219–224
- [43] Rasti M, Azimi T. TP53 binding to BRCA1 and RAD51 in MCF7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines *in vivo* and *in vitro*. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2015, **7**(2): 76–79
- [44] Kulkarni A S, Fortunato E A. Modulation of homology-directed repair in T98G glioblastoma cells due to interactions between wildtype p53, Rad51 and HCMV IE1-72. *Viruses*, 2014, **26**; **6**(3): 968–985
- [45] 陈汉春, 彭兴华. Rad51 同系物与 DNA 重组修复. 国外医学遗传学分册, 2003, **26**(4): 194–197
- Chen H C, Peng X H. *Foreign Medical Sciences (Section of Genetics)*, 2003, **26**(4): 194–197
- [46] Bennett B T, Knight K L. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem*, 2005, **96**(6): 1095–1109
- [47] Forget A L, Bennett B T, Knight K L. Xrcc3 is recruited to DNA double strand breaks early and independent of Rad51. *J Cell Biochem*, 2004, **93**(3): 429–436
- [48] Somyajit K, Saxena S, Babu S, *et al.* Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled forks and mediate replication restart. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(20): 9835–9855
- [49] Liu J, Renault L, Veaute X, *et al.* Rad51 paralogues Rad55-Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature*, 2011, **479**(7372): 245–248
- [50] Godin S, Wier A, Kabbinavar F, *et al.* The Shu complex interacts with Rad51 through the Rad51 paralogues Rad55-Rad57 to mediate error-free recombination. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(8): 4525–4534
- [51] Xu X, Ball L, Chen W, *et al.* The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass *via* physical interaction with a Rad51 paralogue. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e81371
- [52] Taylor M R, Špiřek M, Chaurasiya K R, *et al.* Rad51 paralogs remodel pre-synaptic Rad51 filaments to stimulate homologous recombination. *Cell*, 2015, **162**(2): 271–286
- [53] McClendon T B, Sullivan M R, Bernstein K A, *et al.* Promotion of homologous recombination by SWS-1 in complex with RAD-51 paralogs in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2016, **203** (1): 133–145
- [54] West S C. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(6): 435–445
- [55] Gaines W A, Godin S K, Kabbinavar F F, *et al.* Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of *S. cerevisiae* Rad51 paralogues with Rad52. *Nat Commun*, 2015, **96**(6): 7834
- [56] Gibb B, Ye L F, Kwon Y, *et al.* Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(10): 893–900
- [57] Machida S, Takaku M, Ikura M, *et al.* Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep*, 2014, **4**: 4863
- [58] Wright W D, Heyer W D. Rad54 functions as a heteroduplex DNA pump modulated by its DNA substrates and Rad51 during D loop formation. *Mol Cell*, 2014, **53**(3): 420–432
- [59] Mason J M, Dusad K, Wright W D, *et al.* RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(6): 3180–3196
- [60] Bugreev D V, Huang F, Mazina O M, *et al.* HOP2-MND1 modulates RAD51 binding to nucleotides and DNA. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4198
- [61] Zhao W, Sung P. Significance of ligand interactions involving Hop2-Mnd1 and the RAD51 and DMC1 recombinases in homologous DNA repair and XX ovarian dysgenesis. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(8): 4055–4066
- [62] Gao M, Wei W, Li M M, *et al.* Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Cell Res*, 2014, **24**(5): 532–541
- [63] Yamanaka S, Siomi H. diRNA-Ago2-RAD51 complexes at double-strand break sites. *Cell Res*, 2014, **24**(5): 511–512
- [64] Takizawa Y, Qing Y, Takaku M, *et al.* GEMIN2 promotes accumulation of RAD51 at double-strand breaks in homologous recombination. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(15): 5059–5074
- [65] Pietrobon V, Fréon K, Hardy J, *et al.* The chromatin assembly factor 1 promotes Rad51-dependent template switches at replication

- forks by counteracting D-loop disassembly by the RecQ-type helicase Rqh1. *PLoS Biol*, 2014, **12**(10): e1001968
- [66] Lee S A, Roques C, Magwood A C, *et al.* Recovery of deficient homologous recombination in Brca2-depleted mouse cells by wild-type Rad51 expression. *DNA Repair (Amst)*, 2009, **8** (2): 170–181
- [67] Tarsounas M, Davies D, West S C. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene*, 2003, **22**(8): 1115–1123
- [68] Wang A T, Kim T, Wagner J E, *et al.* A Dominant mutation in human RAD51 reveals its function in DNA interstrand crosslink repair independent of homologous recombination. *Mol Cell*, 2015, **59**(3): 478–490
- [69] Klein H L. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair*, 2008, **7**(5): 686–693
- [70] Hannay J A, Liu J, Zhu Q S, *et al.* Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Mol Cancer Ther*, 2007, **6**(5): 1650–1660
- [71] Ward A, Khanna K K, Wiegman A P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer Treat Rev*, 2015, **41** (1): 35–45
- [72] Liu G, Xue F, Zhang W. miR-506: a regulator of chemo-sensitivity through suppression of the RAD51-homologous recombination axis. *Chin J Cancer*, 2015, **34**(11): 485–487

Homologous Recombination and The Regulation of Recombinase Rad51*

ZHOU Hua-Min¹⁾, SUN Xu-Li¹⁾, CHEN Jian-Ming^{1,2)**}

¹⁾ The State Key Laboratory of The Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

²⁾ The Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, China)

Abstract Homologous recombination (HR) is an important biological activity in the cells, indispensable for the maintenance of genome integrity and stability and closely relative to the human health. In recent years, there is a great progress in this field. Here, we recapitulated four models of HR repair for DNA double-strand break, the mechanism for recombinase RacA/Rad51 action, and the regulation of Rad51 by Rad51 mediators involved in the process of Rad51 nuclear localization, Rad51 binding to ssDNA, homologous DNA pairing, strand invasion and exchange. It is helpful to profoundly understand the HR.

Key words HR, RecA, Rad51, Rad51 mediators, regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0171

* This work was supported by a grant from Open Research Fund of State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Xiamen University (SKLCSB2016KF003).

**Corresponding author.

Tel: 86-592-2187921, E-mail: chenjm@xmu.edu.cn

Received: August 25, 2016 Accepted: October 27, 2016