

# 解析 DNA 损伤应答之路

许鑫, 付钰\*

微生物资源前期开发国家重点实验室, 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

\* 联系人, E-mail: fuyu@im.ac.cn

2015年度的 Albert Lasker 基础医学研究奖授予美国罗格斯大学(Rutgers University)的 Evelyn M. Witkin 教授和哈佛医学院附属布莱根妇女医院(Brigham and Women's Hospital)的 Stephen J. Elledge 教授, 以表彰他们在 DNA 损伤应答反应研究上所作出的杰出贡献。

DNA 是遗传信息的载体, 如果 DNA 的组成或者结构发生改变, 会导致其所承载的遗传信息发生更改, 引起基因变异, 甚至是细胞的死亡。而在细胞中, DNA 持续面临着各种来自于细胞内外的化学物质和物理因素所诱导产生的损伤。据统计, 在一个人体细胞中每天会有至少 60000 次的 DNA 损伤发生<sup>[1]</sup>。同时, DNA 不仅面临自身的物理或者化学性质损伤, 而且在其复制过程中, 如果遇到任何障碍导致 DNA 复制无法完成, 也会产生基因突变缺失、细胞死亡等严重的后果。因此细胞在长期的进化过程中, 发展出了应对 DNA 损伤和 DNA 复制受阻的策略, 即 DNA 损伤应答反应, 通过复杂的调控机制来实现高效快速修复 DNA 损伤, 消除 DNA 损伤给细胞带来的不利后果。今年的 Lasker 基础医学奖得主 Evelyn Witkin 教授在发现原核生物中的 DNA 损伤应答调控: SOS 应答途径作出决定性的贡献; Stephen Elledge 教授则在真核生物的 DNA 损伤应答调控上作出了开创性的贡献。

我们现在已经知道细菌的 SOS 应答途径是一个应对 DNA 损伤的复杂调控体系, 这个体系可以控制将近 70 个基因的表达。在细菌的 DNA 受到损伤后, 例如紫外照射形成不正常的 DNA 结构, 细菌正常的 DNA 聚合酶无法通过这些损伤位点并完成复制, 因而被阻滞在 DNA 损伤处。这时, 由于复制解旋酶的作用, 在复制叉的前方形成大量的 DNA 单链区域。细菌中的 RecA 蛋白可以结合这些单链 DNA, 同时 RecA 的水解酶活性被激发, 从而降解细菌的 LexA 蛋白。LexA 是一个抑制蛋白, 它可以结合于细菌基因的启动子来抑制基因的转录表达。有意思的是, LexA 也可以抑制自身和 RecA 的表达。当 DNA 受到损伤后, 激活的 RecA 降解 LexA, 促进 RecA 的表达, 迅速降低 LexA 的水平, 进而诱导控制细胞分裂的基因、DNA 修复相关基因和容易通过 DNA 损伤部位的特殊 DNA 聚合酶的表达, 抑制细胞分裂、快速地修复 DNA 损伤或者进行跨损伤 DNA 合成。一旦 DNA 损伤修复完成, 单链 DNA 区域消失,



**付钰** 中国科学院微生物研究所研究员。1997 年在中国科学院遗传研究所获硕士学位, 2008 年于加拿大萨斯喀彻温大学微生物与免疫学系获博士学位, 2008~2012 年在美国哈佛大学医学院生物化学与分子药理学系从事博士后研究, 2012 年入选国家“青年千人计划”受聘于中国科学院微生物研究所, 主要致力于在单细胞单分子水平解析 DNA 复制、DNA 损伤修复以及细胞间通讯的生物化学机制。

RecA 的水解酶活性下降, LexA 恢复到一定的水平, 重新开始抑制先前损伤诱导的基因表达, 从而完成应激调控(图 1)。在 40 年前, 这个调控体系的发现是艰难而不平凡的, Evelyn Witkin 教授在解析 SOS 应答途径的历程中作出了巨大的贡献。

时间穿越到 1944 年 6 月, Evelyn Witkin 作为哥伦比亚大学的博士生在冷泉港实验室开始了利用紫外线和 X-射线照射大肠杆菌来诱导突变体的实验之旅。作为一个初学者, 她并没有意识到她第一次的实验使用了剂量过大的紫外照射。不出意外, 培养皿中 99% 以上的细胞被杀死, 但是有 4 个大肠杆菌突变体成活了下来。这些突变体表现出较野生型高 100 倍的紫外照射耐受能力, 引起了冷泉港科学家们的极大兴趣, 并成为了 Evelyn Witkin 博士论文的研究内容。Evelyn Witkin 发现野生型的大肠杆菌在紫外照射后出现很长的分裂延滞时间, 细胞形态延伸成丝状结构, 最后细胞死亡; 然而突变体只展现了较短的延滞, 不延伸成丝状结构, 会继续进行细胞分裂。在当时, 分子生物学还没有开始萌芽, 人们甚至还不知道 DNA 是遗传物质, 而对于这个现象, Evelyn Witkin 天才地猜想紫外照射可能促进合成一种细胞分裂抑制因子, 这种因子的合成随着照射剂量的增大而加强, 大量合成细胞分裂因子会造成细胞停止分裂并死亡。博士毕业后, Evelyn Witkin 继续留在冷泉

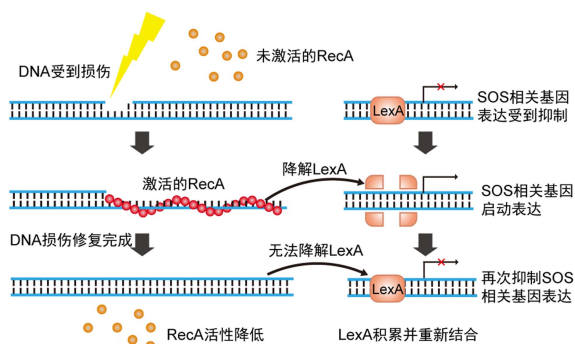


图1 以大肠杆菌为例的原核生物 SOS 应答途径

港工作了10年。1955年，她在纽约州立大学 Downstate 医学中心开始了自己独立的研究。1971年，Evelyn Witkin 来到罗格斯大学任教，直到1991年退休。Evelyn Witkin 在其科研生涯中始终关注紫外照射对细菌的杀伤和细菌如何应对这种杀伤，她的科研工作也由最初研究细菌产生突变的机理，自然拓展到细菌应答并修复 DNA 损伤的分子机制。

在纽约州立大学期间，Evelyn Witkin 发现了紫外照射本身不会引起遗传突变，而是照射后的一些细胞活动引起遗传突变。她创造性地提出了嗜错性 DNA 复制聚合酶的概念，这种嗜错性 DNA 复制聚合酶在 DNA 复制过程中于紫外照射造成损伤的部位随机性插入碱基，而这些碱基往往不是正确配对的碱基，因此造成了可遗传的突变。在1967年左右，Evelyn Witkin 注意到了 Jacob 和 Monod 关于  $\lambda$  噬菌体的工作，Jacob 和 Monod 发现紫外线的照射可以通过降解  $\lambda$  抑制蛋白诱导在大肠杆菌中沉默的  $\lambda$  噬菌体激活。她敏锐地将噬菌体激活和紫外照射阻止细菌分裂两个现象联系起来，提出紫外照射诱导合成细胞分裂抑制因子这一过程是受与  $\lambda$  抑制蛋白类似的抑制蛋白所调控：在没有照射的情况下，由于抑制蛋白的作用，分裂抑制因子不合成，在紫外照射后，细菌启动某种机制，使抑制蛋白降解，从而造成分裂抑制因子的合成和沉默  $\lambda$  噬菌体的激活，这是细菌 SOS 途径理论的雏形<sup>[2]</sup>。Evelyn Witkin 的理论得到众多研究结果的支持，参与调控的关键蛋白也一一被发现。在重组蛋白 RecA 被报道参与紫外照射后的  $\lambda$  噬菌体激活和抑制细胞分裂后，Evelyn Witkin 实验室在1973年发现紫外诱导突变需要 LexA 蛋白。两年后，她的实验室证明 RecA 也参与紫外诱导突变。Evelyn Witkin 和 Miroslav Radman 结合自己和他人的研究，逐渐完善了细菌 SOS 途径理论。Evelyn Witkin 在1976年发表的综述文章中完整地总结了当时已知的紫外照射如何引起细菌遗传突变和诱导 DNA 损伤修复的分子机制，SOS 应答途径至此整体呈现出来<sup>[3]</sup>。

20世纪80年代，在已经比较深入了解细菌中的 SOS 应答途径的基础上，人们开始探讨在真核生物中是否也存

在类似细菌的 SOS DNA 损伤应答途径。得益于酿酒酵母简单方便的遗传操作，酿酒酵母这个单细胞真核生物成为了研究真核 DNA 损伤应答反应的宠儿。1984年，Stephen Elledge 在麻省理工获得博士学位后加入了斯坦福大学 Ron Davis 的实验室从事博士后研究，开始在酿酒酵母中寻找细菌 RecA 蛋白的同源蛋白。他利用  $\lambda$  gt11 噬菌体库表达酵母蛋白，然后使用抗 RecA 的抗体筛选 RecA 的同源蛋白。然而，他没有发现真核生物的 RecA，却无意筛到了羧基端与 RecA 有4个相同氨基酸组成的 Rnr2，即核糖核酸还原酶(RNR)的小亚基。核糖核酸还原酶是催化从 NTP 脱氧合成 dNTP 的关键酶。显然与计划寻找的 RecA 同源蛋白有很大的差距，Stephen Elledge 觉得很沮丧，把这个课题暂时放到了一旁。David Stillman 的来访改变了这一切。在与 David Stillman 的交谈中，他得知核糖核酸还原酶的表达受到细胞周期的严格调控。Stephen Elledge 立即联想到他在先期实验中发现 RNR2 的表达水平可以被诸如 4NQO 等 DNA 损伤试剂诱导 20 倍以上，这和 RecA 被 DNA 损伤试剂的诱导表达一模一样，一个观点在他的脑海里慢慢建立起来。细胞中可能存在一种机制监测 DNA 的复制，当复制又受到某种损害而无法完成正常的复制时，可能会生成某种信号并传导给下游的调控基因，从而诱导或者抑制这些基因的表达来完成对受损 DNA 复制叉的修复。Stephen Elledge 深入研究了 RNR2 的启动子及其被 DNA 损伤试剂和细胞周期诱导表达的机制，并陆续发现了编码核糖核酸还原酶大亚基的基因 RNR1 和另一个小亚基的基因 RNR3<sup>[4]</sup>。值得一提的是 RNR3 基因，这个基因在正常的情况下表达量很低，但是在 DNA 受损的情况下，表达量可以增加 100 倍或者更多。在这个时期，一系列 RAD 基因陆续被发现，其中有些 RAD 基因被突变后，细胞受到 DNA 损伤后并不导致细胞周期的延滞，这些基因被称为细胞周期检验点基因。这些发现引起了 Stephen Elledge 的注意，他开始思考把细胞周期检验点基因与他研究的 RNR 基因联系起来，是否可以应用 RNR 基因来研究真核生物复杂的 DNA 损伤应答调控网络。

1989年 Stephen Elledge 在贝勒医学院开始了自己独立的研究。在他自己的实验室，Stephen Elledge 和他的学生利用新颖的遗传筛选手段很快地筛选到了酵母中影响 RNR 基因表达的基因。Dun1，一个磷酸激酶，被发现可以调节 RNR 基因的表达。Dun1 可以在 DNA 受损的情况下被磷酸化，从而催化自身的磷酸化来调控 RNR 基因的表达<sup>[5]</sup>。这样，第一个真核 DNA 损伤应激反应的重要磷酸蛋白激酶在 Stephen Elledge 的实验室被发现，因此，真核生物的 DNA 损伤应激反应通过磷酸化传递信息的信号传递途径开始呈现其还不很清晰的轮廓。同时，Elledge 实验室筛选到了一系列 SAD 基因(由突变后无法阻滞 DNA 损伤造成的 S 期延长而得名)，其中包括 Weinert 和 Hartwell 发现的 RAD 系列基因 RAD53 和 MEC1。他们随后的工作证明了

Rad53 也是一个磷酸蛋白激酶, 并且位于 Dun1 的上游, 而 Mec1 则是又一个磷酸蛋白激酶, 它可以在 DNA 受到损伤的条件下磷酸化 Rad53. 至此, 在酵母细胞中的 DNA 损伤应激反应通路基本清楚. 与细菌中 DNA 损伤的信号通过降解 LexA 传递不同, 在真核酵母细胞中, DNA 损伤或者复制叉的阻滞激发 Mec1 的磷酸化, 磷酸化的 Mec1 可以磷酸化下游的 Rad53, 磷酸化的 Rad53 继续磷酸化激活下游的 Dun1, 通过一系列的磷酸化将信号放大传递至信号通路的下游. 激活的 Dun1 可以通过磷酸化各种转录调控因子与相应启动子的结合从而调节基因的表达, 进而抑制细胞周期进程、修复受损的 DNA, 甚至诱导细胞程序化死亡(哺乳动物中, 酿酒酵母的程序化死亡没有报道受 Dun1 调控)(图 2). Stephen Elledge 在利用酵母为模式生物研究真核生物 DNA 损伤应答途径的同时, 也在哺乳动物中开展 DNA 损伤研究, 独立或者通过与其他实验室的合作解答了许多关于哺乳动物 DNA 损伤应答途径的关键问题, 例如 ATR(酵母 Mec1 的同源蛋白)如何控制细胞周期、F-box 蛋白通过泛素化调节细胞功能的机制等.

在 2003 年加入哈佛医学院后, Stephen Elledge 继续拓展在 DNA 损伤应答反应上的研究. 他利用组学技术高通量筛选磷酸化蛋白, 鉴定了 700 多个可被 ATM/ATR 途径磷酸化的蛋白; 从组学的层面分析了受到 DNA 损伤后, 染色质上结合的各种蛋白的乙酰化和泛素化修饰, 以期更深入地回答真核生物 DNA 损伤应答途径悬而未决的问题.

DNA 损伤应答途径是生物有效应对 DNA 损伤的复杂调控体系. DNA 损伤应答途径可以在第一时间检测到 DNA 损伤, 并通过特殊的机制将 DNA 损伤信号放大并传递给下游的执行蛋白, 进行快速的响应来修复损伤, 保持基因组的稳定性<sup>[7]</sup>. 现在已知很多疾病与 DNA 损伤应答

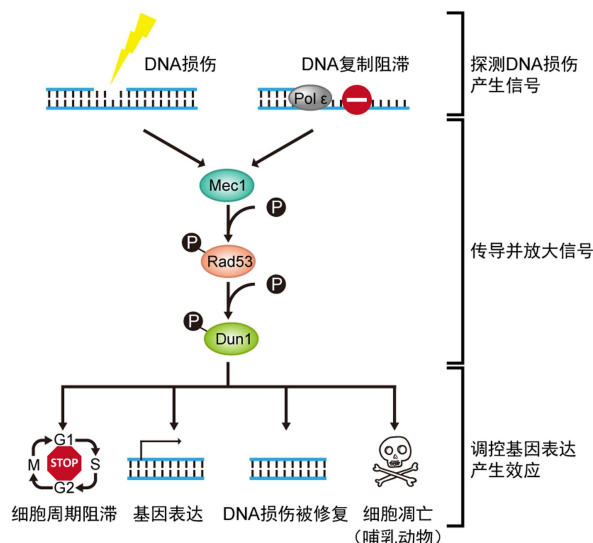


图 2 以酿酒酵母为例的真核生物 DNA 损伤应答途径

途径密切相关, 例如, DNA 损伤应答途径出现缺陷会导致肿瘤的发生, 遗传病共济失调性毛细血管扩张症(Ataxia telangiectasia)是由于 ATM 的缺陷引起的等等. 另外, DNA 损伤应答途径也被发现与衰老密切相关. 深入认识 DNA 损伤应答途径的分子机理, 对于癌症的预防和治疗, 延缓衰老, 促进人类健康生活有重要的理论指导意义. 尽管包括 Evelyn Witkin 和 Stephen Elledge 等众多的科学家的努力, 我们对于原核和真核的 DNA 损伤应答途径已经有了相当的了解, 但是基于这些途径的复杂性, 还有大量的问题需要我们进一步研究, 通过对 DNA 损伤应答途径的详细解析, 可以窥斑知豹, 帮助我们最终理解生命与进化的奥秘.

## 推荐阅读文献

- Bernstein C, Prasad A R, Nfonsam V, et al. DNA damage, DNA repair and cancer. In: Chen C, ed. New Research Directions in DNA Repair. Croatia: InTech, 2013
- Witkin E M. The radiation sensitivity of *Escherichia coli* B: A hypothesis relating filament formation and prophage induction. Proc Natl Acad Sci USA, 1967, 57: 1275-1279
- Witkin E M. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. Bacteriol Rev, 1976, 40: 869-907
- Elledge S J, Davis R W. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. Genes Dev, 1990, 4: 740-751
- Zhou Z, Elledge S J. *DUN1* encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. Cell, 1993, 75: 1119-1127
- Allen J B, Zhou Z, Siede W, et al. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. Genes Dev, 1994, 8: 2401-2415
- Ciccica A, Elledge S J. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. Mol Cell, 2010, 40: 179-204