

ATDC 基因抗电离辐射机制的研究进展

王志文 常 浩 王丽丽 王胜发

摘 要 放射治疗在肿瘤综合治疗领域中有着举足轻重的地位,放射治疗的效果与肿瘤细胞对辐射敏感度密切相关。AT-DC 基因也称为 TRIM29,在人体众多肿瘤中高表达,具有显著的抗电离辐射的特性。本文综述了 ATDC 抗电离辐射的特性与 DNA 损伤修复程序存在紧密的相关性,为临床肿瘤放射治疗的合理运用提供了一定的理论依据。

关键词 ATDC RNF8 DSB DDR 抗电离辐射性

中图分类号 R34 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.047

抗癌治疗如电离辐射(ionizing radiation, IR)能够诱导肿瘤细胞的 DNA 损伤,造成 DNA 结构的破坏,抑制或杀死肿瘤细胞,因此放疗的效果与肿瘤细胞对电离辐射的敏感度有关。积极寻找相关生物因子来降低肿瘤细胞对辐射的耐受性,并减少电离辐射对正常组织的损伤,是近年来放射治疗领域研究的靶标之一。ATDC 在胰腺癌、结肠癌、肺癌等众多肿瘤中过表达,其表达水平与患者的预后息息相关。ATDC 能够调控肿瘤细胞对电离辐射的敏感度,参与放射抵抗。

一、ATDC 基因结构和功能的概述

ATDC 克隆于共济失调性毛细血管扩张症患者的细胞,该疾病的特点是共济失调性毛细血管扩张突变基因(ataxia telangiectasia - mutated, ATM)的缺失。ATDC 也属于三结构域蛋白(tripartite motif - containing, TRIM)家族的一员,TRIM 蛋白家族通常具有一系列的保守结构域,包括 1 个 RING(R)区,1 个 B box type1(B1)区和 1 个 B box type2(B2)区,以及 1 个 coiled-coil(CC)区。虽然这些结构域在不同的 TRIM 蛋白中不尽相同(ATDC 包含 B1-B2-CC 结构域,但缺少 R 结构域),但是 TRIM 蛋白家族的结构域却始终保持 R-B1-B2-CC 的排列顺序。ATDC 可与中间丝蛋白、波形蛋白、蛋白质 hPKC α -1、p53 基因、组蛋白脱乙酰酶(HDAC9)和组蛋白乙酰化转移酶(Tip60)相互反应,共同调控 DNA 损伤修复^[1-3]。ATDC 表达于多个肿瘤类型,是一种典型的

侵袭性肿瘤标志物^[4-6]。在胰腺癌细胞中,ATDC 已经被证明通过其蜷曲螺旋结构域与 DVL-2 相互作用,促进细胞的增殖侵袭^[7]。ATDC 能与 P53 作用,抑制 P53 的核活动,影响细胞周期进程^[2]。因此 ATDC 抗电离辐射的机制可能与细胞周期的调控、DNA 损伤修复密切相关。

二、IR 促进 ATDC 转位入核与染色质结合抗 DNA 损伤

ATDC 同时存在于肿瘤细胞的细胞核及细胞质中,其绝大部分主要存在于细胞的细胞质和细胞骨架,而在某些细胞系中 ATDC 主要存在于细胞核^[2,8]。低剂量的 IR(注:本文放射性实验所用的 IR 都为低剂量的 X 射线)能引起 DNA 的损伤,尤其是 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSB),导致细胞的死亡或者凋亡。机体相应的会启动特定的 DNA 修复程序与相关生物活性因子联合决定细胞的命运。DNA 修复程序主要是在细胞核内启动,ATDC 参与 DNA 损伤修复的先决条件是可自由出入细胞核孔。Yang 等^[9]针对 IR 是否影响细胞内 ATDC 的分布进行了探索性实验。证明 IR 能促进细胞质内 ATDC 向细胞核内转位且与放射剂量和时间存在依赖性。入核后的 ATDC 以主动分泌或被动分泌的方式释放入细胞质。ATDC 细胞核内卷曲螺旋结构域是调控电离辐射作用下 ATDC 转位的本质结构。细胞核内 ATDC 主要与染色质结合,其蛋白表达水平与电离辐射作用下核内 DNA 双链断裂的数目存在显著差异,核内 ATDC 蛋白表达水平的提高可明显降低 DNA 双链断裂的数目。因此 ATDC 在功能上对电离辐射的耐受可能与 IR 对 ATDC 在细胞内分布的结构改变相关,为进一步探索 ATDC 参与细胞周期调控、DNA 损伤修复机制奠定了理论基础。

基金项目:黑龙江省教育厅基金资助项目(2013SYRYCYJ01)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院(王志文),胸外科(常浩、王胜发);150000 哈尔滨市第一医院胸外科(王丽丽)

通讯作者:常浩,副教授,硕士生导师,电子信箱:zhanxiaorongai@163.com

三、ATDC 调控细胞周期检查点促进 DNA 修复

IR 诱导的 DNA 损伤,尤其是 DNA 双链断裂,可以激活细胞内复杂的 DNA 损伤反应程序(DNA damage response, DDR)。DDR 是通过一系列复杂的 DNA 损伤感应器、信号转导通路和效应蛋白来阻止细胞周期进程并修复受损的 DNA 结构。具体而言当细胞暴露于 IR 时,核内染色质拓扑结构的改变快速激活 DNA 损伤感应器 ATM、ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 - related)和 DSB 中的 DNA - PK 位点所介导的 H2AX 磷酸化,其中 ATM 的磷酸化是 DDR 的关键点。ATM 的磷酸化需要超过 700 种基质参与,尤其是 SQ/TQ 氨基酸序列,而组蛋白变体 H2AX 是 ATM 磷酸化的基底结构,磷酸化的 SQ 氨基酸序列与 H2AX 核内整合,促进 DNA 损伤反应复合物 NBS1、MDC1、53BP1、BRCA1 等招募到 DNA 损伤位点促进 DNA 的修复^[10,11]。

ATDC 是蛋白激酶 C 的底物,存在着丝氨酸和苏氨酸的磷酸化,而蛋白激酶 C 已经被证明与 ATDC 的侵袭转移相关^[12,13]。ATDC 下游丝氨酸残基是 ATM 磷酸化的靶点^[7],当细胞暴露于电离辐射时,ATDC 丝氨酸 550 残基的 C 端结构能与 ATM 磷酸化中的 SQ 氨基酸序列结合,从而提高 ATDC 的抗电离辐射性。具体方式包括两种途径,分别是 P53 依赖途径和非 P53 依赖途径。在 P53 依赖途径中,P53 和 Chk1/2 是 ATM 磷酸化的基底结构,共同调控细胞周期检查点,引起 G₁ 期、S 期和 G₂/M 期的活化,并稳定 P53,上调 P21 的表达水平,阻滞细胞周期蛋白 CDC25A 活性,引起 S 期和 G₂ 期细胞检查点的阻滞,为 DNA 双链断裂的修复保留充足时间以此来提高抗电离辐射性。在非 P53 依赖性通路中,ATDC 抗电离辐射性主要被 MAPKAPK2 (MARK - activated protein kinase2, MK2) 介导调控^[14]。MAPKAPK2 是 P38 激酶参与修复放化疗 DNA 损伤程序机制的下游靶点。P38 激酶的活性依赖 ATM 磷酸化,当 IR 造成 DNA 损伤时,ATDC 下游基因序列能与 MK2 结合并介导 CDC25B 和 CDC25C 的磷酸化直接调控 G₂/M 和 G₁ 期细胞周期检查点。两种通路最终都能阻滞细胞周期检查点,为 DNA 修复提供时间保障。

四、ATDC - RNF8 相互作用促进 DNA 修复

RNF8 (ring finger protein8) 是一种含有 485 个氨基酸残基的核多肽,RNF8 蛋白含有 N 端的 FHA 结构域和 C 末端的 RING 结构域^[15]。IR 对细胞的毒性主要是 DNA 双链的断裂,RNF8 - FHA 结构域具有定

位照射后的 DNA 损伤部位的功能,促进 γ H2AX 的单泛素化和 53BP1 和 BRCA1 等 DNA 修复蛋白招募到 DNA 双链断裂位点,在 RNF8 泛素链接酶的催化下,53BP1 和 H2AX 的磷酸化促进 DNA 双链的修复^[16-18]。 γ H2AX 的单泛素化和 53BP1 的磷酸化是 DNA 双链修复不可或缺的部分,且 H2AX 和 BRCA1 损伤位点是 DNA 双链断裂的标志物。因此 γ H2AX 的单泛素化水平和 53BP1、H2AX 的磷酸化水平可作为 DNA 双链断裂修复的靶向监测指标。Yang 等^[9]利用该原理检测电离辐射处理后的 HEK293 细胞系中 γ H2AX 的单泛素化水平和 53BP1、H2AX 的磷酸化水平。证明了 ATDC 能上调 RNF8 调控的 IR 诱导的 γ H2AX 单泛素化水平以及 53BP1 及 H2AX 的磷酸化水平。RNF8 是 ATDC 基因的协同蛋白,ATDC - RNF8 泛素链接酶的相互作用可能共同调控 ATDC 抗辐射性。

ATDC 暴露于电离辐射时其下游基因序列是 ATM 和 MAPKAPK2 的磷酸化靶点。ATDC 下游基因序列存在着 N 端和 C 端结构域,Yang 等^[9]分别对全长的 ATDC、缺乏 N 端的 ATDC、缺乏 C 端的 ATDC、以及无 ATDC 表达的 HEK293 细胞系用电离辐射处理,并检查 HEK293 系细胞的存活率。证明了 ATDC 的 N 端或 C 端结构是调控抗 IR 性的基因序列。ATDC 本身缺乏内在酶学功能而 RNF8 泛素链接酶是 ATDC 蛋白多功能作用的辅助因子,经过共价修饰(磷酸化、乙酰化)与细胞质和核内的多种蛋白质相结合一起调节细胞存活及 DNA 损伤修复,提高 ATDC 的抗电离辐射性,具体机制如下:RNF8 在 HEK293 细胞系的细胞核内过表达,ATDC 在细胞质和细胞核内表达,其中 80% 存在于细胞质内,20% 位于细胞核内,IR 能够促进 ATDC 转位入核且受 ATDC 细胞核内的卷曲螺旋结构域调控。RING 结构域是 RNF8 启动子区域的结合位点位于细胞核内,入核后 ATDC 的 C 端结构域能与 RNF8 - RING 结构域反应^[9]。

核内 ATDC - RNF8 相互反应时,ATDC、RNF8 以 ATM 依赖的方式被激活,通过组蛋白泛素化和 DNA 修复因子来促进 DNA 修复复合物与 DNA 双链断裂的损伤位点结合。随着 H2AX 磷酸化,RNF8 的 RING 结构域和泛素链接酶招募到 DNA - DSB,RNF8 催化泛素与 H2A 和 H2AX 反应,促进 53BP1 和 BRCA1 结合到 DNA 损伤位点促进 DNA 的修复^[19]。ATDC - RNF8 的相互反应虽然对最初的 RNF8 或者 BRCA1 位点的形成没有作用,但加速了这些位点的

消失,促进了 DNA 双链断裂的修复进程。就目前研究而言 ATDC - RNF8 的相互反应调控 RNF8 的准确机制尚未完全理解,但是 ATDC 已被证明与 TIP60 结合,参与非水溶性重塑、提高 RNF8 泛素链接酶的活性促进 DNA 损伤的修复,另外大量的研究结果已经证明,ATDC 和 RuvBL2 (Tip48)是 p400/NuA4 复合物的另一个成员能调节 RNF8 的活动^[3,20]。可见 ATDC 与 RNF8 的相互作用可促进 DNA 损伤的修复。

五、ATDC 的临床运用展望

电离辐射治疗所致的 DNA 损伤诱导细胞死亡或凋亡仍然是当代肿瘤治疗领域的一项不可或缺的部分。电离辐射能够促进 ATDC 的转位,且与电离辐射的剂量和照射时间存在依赖关系,那么 ATDC 也许可以作为评估电离辐射损伤的一种生物分子标志物,在临床治疗中评估电离辐射的剂量从而指导治疗,与此同时可以针对 ATDC 基因抗电离辐射的特性进行药物或者基因增敏,在临床诊疗中制定个体化救治方案,为电离辐射损伤的救治措施提供理论依据。在肿瘤放疗领域,可以针对 ATDC 抗电离辐射性与 DNA 修复因子 RNF8 密切相关性的特点,运用基因工程的方法制作相关分子的抑制因子,消弱各种肿瘤细胞中 ATDC 对电离辐射的抵抗性,强化 IR 对癌细胞的电离效应,提高放疗的有效率,减少不良反应,或者 ATDC 可以作为一个有效的药物靶点来指导临床治疗。

虽然 ATDC 抗电离辐射特性的相关基础研究已经取得一定成果,但是临床实验数据却相对不足,存在着很多缺陷。ATDC 在多种肿瘤细胞中高表达,但 ATDC 在细胞内的含量受肿瘤的类型、肿瘤的分期、淋巴结转移情况、患者放疗前后的身体状态等诸多因素的影响,所以 ATDC 基因抗电离辐射的机制只能为肿瘤放疗领域提供一种新的理论研究方向,运用于临床还有待于进一步研究。

参考文献

- Yuan Z, Peng L, Radhakrishnan R, *et al.* Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein [J]. J Biol Chem, 2010, 285(50): 39329 - 39338
- Yuan Z, Villagra A, Peng L, *et al.* The ATDC (TRIM29) Protein Binds p53 and Antagonizes p53 - Mediated Functions[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(12): 3004 - 3015
- Sho T, Tsukiyama T, Sato T, *et al.* TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813 (6): 1245 - 1253
- Jiang T, Tang HM, Lu S, *et al.* Up - regulation of tripartite motif - containing 29 promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival in colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(4): 715
- Tang ZP, Dong QZ, Cui QZ, *et al.* Ataxia - telangiectasia group D complementing gene (ATDC) promotes lung cancer cell proliferation by activating NF - κ B pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e63676
- Lai W, Zhao J, Zhang C, *et al.* Upregulated ataxia - telangiectasia group D complement - ing gene correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dis Esophagus, 2013, 26(8): 817 - 822
- Wang L, Heidt DG, Lee CJ, *et al.* Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta - catenin stabilization[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3): 207 - 219
- Masuda Y, Takahashi H, Sato S, *et al.* TRIM29 regulates the assembly of DNA repair proteins into damaged chromatin[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7299
- Yang H, Palmboos PL, Kim EH, *et al.* ATDC (ataxia telangiectasia group D complementing) promotes radioresistance through an interaction with the RNF8 ubiquitin ligase[J]. Biol Chem, 2015, 11(17): 27146 - 27157
- Mailand N, Bekker - Jensen S, Fastrup H, *et al.* RNF8 ubiquitylates histones at DNA double - strand breaks and promotes assembly of repair proteins[J]. Cell, 2007, 131(5): 887 - 900
- Huen MS, Grant R, Manke I, *et al.* RNF8 transduces the DNA - damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly[J]. Cell, 2007, 131(5): 901 - 914
- Chen CH, Chiu CL, Kenneth B, *et al.* A novel predictor of cancer malignancy: up - regulation of myristoylated alanine - rich C kinase substrate phosphorylation in lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 189(8): 1002 - 1004
- Fu P, Yang ZY, Leon A. Bach. rohibitin - 2 binding modulates insulin - like growth factor - binding protein - 6 (IGFBP - 6) - induced rhab - domyosarcoma cell migration[J]. J Biol Chem, 2013, 288(41): 29890 - 29900
- Wang LD, Yang HB, Phillip L. *et al.* ATDC/TRIM29 phosphorylation by ATM/MAPKAP kinase 2 mediates radioresistance in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Res, 2014, 74(6): 1778 - 1788
- Jacobs JJ. Fusing telomeres with RNF8[J]. Nucleus, 2012, 3(2): 143 - 149
- Wang B, Elledge SJ. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brc36 complex in response to DNA damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(52): 20759 - 20763
- Yu M, Liu K, Mao Z, *et al.* USP11 is a negative regulator to γ H2AX ubiquitylation by RNF8/RNF168[J]. J Biol Chem, 2016, 291: 959 - 967
- Bertrand - Vallery V, Belot N, Dieu M, *et al.* Proteomic profiling of human keratinocytes undergoing UVB - induced alternative differentiation reveals TRIPartite Motif Protein 29 as a survival factor[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10462
- Bartocci C, Denchi EL. Put a RING on it: regulation and inhibition of RNF8 and RNF168 RING finger E3 ligases at DNA damage sites[J]. Front Genet, 2013, 4: 128
- Xu Y, Sun Y, Jiang X, *et al.* The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair[J]. J Cell Biol, 2010, 191(1): 31 - 43

(收稿日期:2015 - 11 - 21)

(修回日期:2015 - 12 - 28)