致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39630040, 39570399)资助项目.

参 考 文 献

- 1 黄美娟, 黄绍兴, 苏都莫日根, 等. 采用调控培养方法提高胡萝卜体细胞胚活力的研究. 科学通报, 1993, 38(6): 550~553
- 2 Bewley J D. Seed germination and dormancy. The Plant Cell, 1997, 9: 1055~ 1066
- 3 Dure L III. The lea protein of high plants. In: Verma, Desh P S ed. Control of Plant Gene Expression. Florida: CRC Press Inc, 1993, 325~ 335
- 4 Nouredine H, Gerald A B. Preparation of T₂overhanging vectors with high PCR product cloning efficiency. Biotechniques, 1996, 1: 20~ 22
- 5 吴颂如, 陈婉芬, 周 燮. 酶联免疫法(ELISA)测定植物内源激素. 植物生理学通讯, 1988, 5: 53~ 58
- 6 张能刚, 徐义俊, 周 燮. 脱落酸间接酶联免疫检测法的建立. 南京农业大学学报, 1991, 14: 21~ 24
- 7 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南, 第2版. 北京: 科学出版社, 1992
- 8 Seffens W S, Almoguera C, Wilde H D, et al. Molecular analysis of a phylogenetically conserved carrot gene: developmental and environmental regulation. Developmental Genetics, 1990, 11: 65~ 76
- 9 Ackerson R C. Absciscic acid and precocious germination in sobeans. J Exp Bot, 1984, 35: 414~ 421
- 10 Zimmerman J L. Somatic embryogenesis: a model for development in higher plants. The Plant Cell, 1993, 5: 1411~ 1423
- 11 Leung I, Giraudat I. Absciscic acid signal transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1998, 49: 199~ 222
- 12 Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, et al. Current advances in absciscic acid action and signalling. Plant Molecular Biology, 1994, 26: 1557~ 1577
- 13 Rock C D, Quatrano R S. The role of hormones during seed development. In: Davies P J ed. Plant Hormones. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995, 671~ 697
- 14 程玉兰, 刁丰秋, 吴乃虎, 等. 蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞胚内源 ABA 水平的效应. 植物学报, 1999, 41(7): 761~ 765
(1999-03-15 收稿, 1999-06-03 收修改稿)

ATM 介导的蛋白磷酸化在辐射损伤 信号传递过程中的作用

孟祥兵 董 燕 孙志贤*

(北京放射医学研究所, 北京 100850. * 联系人)

摘要 为了阐明 ATM 在介导辐射损伤信号传导中的作用, 对 ATM, σ -Abl 免疫沉淀物激酶活性, 辐射及损伤 DNA 对其活性的影响进行了分析. 结果表明辐射可引起细胞中多种蛋白磷酸化发生改变, p53 上游基因 ATM 突变的 AT 细胞与 ATM 基因正常的同源细胞 HEL 相比, AT 细胞受照后多种蛋白的磷酸化明显减弱. ATM 与 σ -Abl 共沉淀, 催化 p53 在内的多种蛋白磷酸化. ATM, σ -Abl 共沉淀物激酶活性可为辐射及损伤 DNA 活化, 表明 ATM 可识别损伤 DNA 并启动 DNA 损伤信号的传导. ATM 在体外可被磷酸化, 其磷酸化可为 PI3K 家族抑制剂 wortmannin 抑制. 上述结果表明 ATM 在 DNA 损伤识别及信号传导中通过催化多种蛋白磷酸化发挥作用.

关键词 ATM σ -Abl p53 蛋白磷酸化

蛋白质磷酸化-脱磷酸化调控在许多生命过程的调节中都发挥着重要作用, 辐射活化 p53

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-18-1963>

与其N端特异位点磷酸化有关^[1]. *ATM* (ataxia telangiectasia mutant) 是人染色体突变隐性遗传的毛细血管扩张共济失调症致病基因, 含有PI3K激酶家族保守序列, 参与细胞周期调控、有丝分裂中染色体重组、端粒长度监测及DNA损伤细胞学反应^[2~4]. *ATM* 基因遗传缺陷的AT患者来源的细胞, 以及*ATM* 基因敲除的小鼠成纤维细胞 *ATM*^{-/-} MEFs 受照后, p53及下游效应分子p21, Gadd45活化显著减弱并延迟^[5,6]. 但体外实验并未观察到*ATM* 催化重组p53磷酸化, 表明*ATM* 活化p53还涉及其他分子的介导^[7]. 与AT细胞相似, *c-Abl* 基因缺陷细胞受照后辐射诱发的细胞G₁期阻滞异常. 照射可引起细胞形成*c-Abl*/p53复合物, 引起p53依赖的CDK2活性抑制及细胞G₁期阻滞^[8]. Baskaran等人^[9]报道辐射不再活化*ATM* 基因敲除小鼠成纤维及淋巴细胞的*c-Abl*. Shafman等人^[10]报道在*ATM* 野生型细胞*ATM*可组成型地与*c-Abl*结合, 但在*ATM* 突变细胞未观察到*ATM*与*c-Abl*组成型相互作用. 这些研究表明*c-Abl*可能是*ATM*在辐射细胞学反应中*ATM*下游靶分子.

为了探讨*ATM*在辐射损伤信号传导中的作用, 对*ATM*免疫沉淀物激酶活性进行了分析, 探讨了辐射及损伤DNA对其体外磷酸化的激活作用.

1 材料与方法

() 材料. 抗p53(DO-1)单抗, 针对p53氨基末端37~45氨基酸的单抗; 抗*c-Abl*(K-12)多抗, 针对*c-Abl*502~512位*c-Abl*酪氨酸激酶抗原表位的兔多抗(对其激酶活性无抑制作用); 抗*ATM*(N-17)多抗, 为针对*ATM*2~18位氨基酸残基的羊多抗(与PI3K p110无交叉反应); 均购自Santa Cruz Biotechnology公司. protein A/G sepharose 4B, HRP标记抗羊二抗购自Santa Cruz Biotechnology公司. HRP标记抗鼠及抗兔二抗购自Jackson公司.

() 细胞蛋白粗提物的制备. 收集细胞, 4℃1000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀加入100 μL细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH=7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% 胆酸钠, 1 mmol/L 钒酸钠). 冰浴中超声破碎细胞, 4℃放置30 min溶解膜蛋白, 12000 r/min离心, 收集上清. 用Bradford法^[11]测定蛋白含量.

() 免疫沉淀(IP). 细胞蛋白提取液补加细胞裂解液至500 μL, 同时加入一抗5 μL, 4℃放置1 h以上, 加入20 μL交联蛋白A/G的Sepharose 4B, 4℃层析柱中摇4 h以上. 4℃2500 r/min离心5 min, 弃上清, 沉淀用细胞裂解液洗, 离心弃上清, 重复4次, 免疫沉淀悬浮于20 μL细胞裂解液准备测定激酶活性.

() 体外磷酸化反应. 免疫沉淀物加入等体积2×激酶反应缓冲液(40 mmol/L HEPES pH=7.4, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L MnCl₂, 20 mmol/L MgCl₂), 0.5 μL 10 mmol/L ATP, 185~259 kBq γ-³²P ATP, 1 μg经超声损伤的鲑精DNA, 于30℃反应30 min. 加入1/3体积3×SDS-PAGE上样缓冲液, 沸水浴加热5~10 min变性后, 离心将样品加入5%~15% SDS-PAGE梯度胶电泳. 电泳完毕, 经100 V电转移至硝酸纤维素膜(NC膜), 包保鲜膜, 压X光片放射自显影. 自显影完毕的膜, 经Western印迹检测某特定抗原, 或氨基黑染色显示转移至膜上的所有蛋白. Western印迹方法同文献[12].

2 结果和讨论

2.1 AT细胞及HEL细胞体外磷酸化

20 Gy照后15 min *ATM* 基因突变的ATBIV5细胞与*ATM* 基因野生型的同源细胞HEL蛋白

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-18-1963>

体外磷酸化相比, ATBIV5 细胞中蛋白磷酸化明显减弱, 表明 ATM 在 DNA 损伤信号传递中参与磷酸化调控(图 1).

2.2 ATM, p53 免疫沉淀物体外磷酸化及 wort 的影响

来自 20 Gy 照后 1 h HeLa S3 细胞抗 ATM 免疫沉淀物及照后 6 h MCF-7 细胞中抗 p53 免疫沉淀物体外磷酸化, 可使多种蛋白掺入³²P, wortmannin 对该激酶反应有一定抑制作用. 免疫印迹表明, p53 蛋白发生磷酸化, ATM 发生轻微的磷酸化(图 2).

进一步分析表明, ATM 免疫沉淀物体外磷酸化带型, 与 ATM 和 p53 免疫沉淀物混合物体外磷酸化带型相同, 而 p53 免疫沉淀物自身体外磷酸化反应未观察到³²P 掺入蛋白(图 3(a)), 可见磷酸化标记的蛋白来源于 ATM 免疫共沉淀物.

2.3 ATM 与 c-Abl 免疫沉淀物体外磷酸化

为了阐明 ATM 免疫沉淀物中是否包括 c-Abl 激酶, ATM 和 c-Abl 免疫沉淀物分别进行体外磷酸化, 发现标记³²P 的蛋白自显影带型相同, 表明免疫沉淀反应时 ATM 与 c-Abl 共沉淀(图 3(b)).

辐射及损伤 DNA 可明显激活 ATM 和 c-Abl 免疫沉淀物体外磷酸化, 表明 ATM 或其共沉淀分子可识别损伤 DNA, 活化其激酶活性, 起始 DNA 损伤信号的传导(图 4).

图 1 20 Gy 照射后 15 min ATBIV5(1) 及 HEL(2) 蛋白体外磷酸化放射自显影图

图 2 ATM 免疫沉淀物激酶活性及 wortmannin 对其的抑制作用

(a) ATM 及 p53 免疫沉淀物在抑制剂 wortmannin 或溶剂 DMSO 存在下体外磷酸化后放射自显影图; (b) 抗 p53 抗体免疫印迹; (c) 过度曝光检测 ATM 自身磷酸化及 wortmanin 的影响; (d) 抗 ATM 特异抗体免疫印迹

对 AT 细胞与 HEL 细胞受照后提取物体外磷酸化分析表明, ATM 缺陷可导致细胞受照后多种蛋白磷酸化减弱, 表明多种激酶信号传导途径的异常, 与文献报道 AT 细胞 p53, c-Abl, JNK/SAPK 等多种激酶途径异常的结果一致^[13]. ATM, p53 免疫沉淀物体外磷酸化可使多种蛋白掺入³²P, wortmannin 对该激酶反应有一定抑制作用, 表明 ATM 有除 p53 以外多种底物, 在辐射细胞学反应中发挥作用.

ATM和c-Abl免疫沉淀物体外磷酸化, 标记 ^{32}P 的蛋白自显影带型相同, 表明两者共沉淀,

图3 受照细胞抗 ATM, p53 及 c-Abl 免疫沉淀物分别进行体外磷酸化后放射自显影图
(a) ATM, p53 免疫沉淀物体外磷酸化后放射自显影图; (b) ATM, c-Abl 免疫沉淀物体外磷酸化后放射自显影图

图4 体外磷酸化检测辐射及损伤 DNA 对抗 ATM 及 c-Abl 免疫沉淀物磷酸化的影响
(a) 放射自显影检测损伤 DNA 对来源于 MCF-7 细胞 ATM 免疫沉淀物激酶活性的影响; (b) 放射自显影检测辐射及损伤 DNA 对 c-Abl 免疫沉淀物蛋白磷酸化的影响. IR 为来源于受 20 Gy 照射 1 h 后 MCF-7 细胞 c-Abl 免疫沉淀物, CON 为来源于未受照 MCF-7 细胞 c-Abl 免疫沉淀物, ATM 为来源于 20 Gy 照后 1 h HeLa S3 细胞抗 ATM 免疫沉淀物

证实了 Shafman 等人^[10]报道 ATM 与 c-Abl 可组成型相互作用的结果. 实验观察到 ATM 可在体外磷酸化, 表明其含有磷酸化位点, 存在共价修饰调节; 但其是自身磷酸化, 还是被共沉淀的其他激酶如 c-Abl 催化, ATM 磷酸化是否影响其活性还有待探讨. 辐射可激活 ATM/ c-Abl 免疫沉淀物体外磷酸化, 表明辐射损伤的 DNA 激活了 ATM 参与的多种信号系统. 损伤 DNA 可明显激活 ATM, c-Abl 免疫沉淀物体外磷酸化, 表明 ATM 或其共沉淀分子中有 DNA 损伤识别元件, 起始 DNA 损伤信号的传导, 活化 ATM 激酶活性. 目前对 ATM 与 p53 磷酸化调控的研究较多, 但 ATM 基因缺陷的 AT 患者临床症状多种多样, 仅仅从 p53 调控异常并不能得到解释, 故对 ATM 激酶的其他靶分子的研究将有助于加深对 DNA 损伤监视机制的认识.

致谢 感谢周平坤和隋建丽同志提供实验所用细胞系. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39700038) 和总后卫生部“九五”重点基金(批准号: 9605007) 资助项目.

参 考 文 献

- 1 Siliciano J D, Canman C E, Taya Y, et al. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*, 1997, 11: 3471~ 3481
- 2 Westphal C H, Schmaltz C, Rowan S, et al. Genetic interaction between atm and p53 influence cellular proliferation and irradiation induced cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, 1997, 57: 1664~ 1667
- 3 Savitsky K, Sfez S, Tagle D A, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet*, 1995, 4: 2025~ 2032
- 4 Zhang N, Chen P, Khanna K K. Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8021~ 8026
- 5 Artuso M, Esteve A, Brasil H, et al. The role of the Ataxia telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1(p21) and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene*, 1995, 11: 1427~ 1435
- 6 Kastan M B, Zhan Q, El-Deiry W S, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and Gadd45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992, 71: 587~ 597
- 7 Jung M, Kondratyev A, Lee S A. ATM gene product phosphorylates $\text{p34}^{\text{cdc}2}$. *Cancer Res*, 1997, 57: 24~ 27
- 8 Goga A, Liu X, Hambuch T M, et al. p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene*, 1995, 11: 791~ 799
- 9 Baskaran R, Wood L D, Whitaker L L et al. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*, 1997, 387: 516~ 519
- 10 Shafman T, Khanna K K, Kedar P, et al. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*, 1997, 387: 520~ 523
- 11 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~ 254
- 12 Towbin H. Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J Immunol Methods*, 1984, 72: 313~ 340
- 13 Meyn M S. Ataxia-Telangiectasia and cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 1995, 55: 5991~ 6001

(1998-12-07 收稿, 1999-03-26 收修改稿)