

V(D)J基因重排分子缺陷与先天性免疫缺陷病的关系

马俊芳¹ 周定安² 贺林²

摘要 先天性免疫是人体免疫系统抗感染的第一道防线。在脊椎动物,适应性免疫在防范病原起重要作用,依赖于产生各种类型的可溶性膜结合抗原受体,而这些抗原受体表达在 T、B 淋巴细胞表面。免疫球蛋白 (Ig) 和 T 细胞受体 (TCR) 的可变区域是一些基因片段编码。免疫多样性的实现是依赖于 Ig 和 TCR 可变区的 V(D)J 基因重排。本文就参与 V(D)J 基因重排的 RAG1/2、Artemis、DNA 连接酶 IV 和 Cernunnos-XLF 等分子的结构和功能以及这些分子缺陷与先天性免疫缺陷病的关系作一总结。

关键词 V(D)J 基因重排 先天性免疫缺陷病 分子缺陷

Relationship between molecular deficiency of V(D)J gene rearrangement and genetic immunodeficiency diseases

MA Jun-fang ZHOU Ding-an HE Lin

ABSTRACT Innate immunity is primary defense mechanism of human immune system. In vertebrates, adaptive immunity plays an important role in precaution against pathogeny, which is dependant on the generation of various type of dissolvable conjugated antigen receptor of cell membrane, expressing on the cell surface of T, B lymphocytes. The variable regions of immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR) are encoded by some gene segments and V(D)J gene rearrangement of variable regions of Ig and TCR are required for the accomplishment of immune diversity. In this article, we intend to conclude the molecule constructure and function of RAG1/2, Artemis, DNA-ligase-IV and Cernunnos-XLF etc which participate in V(D)J gene rearrangement and further illustrate the relationship between deficiency of these molecule above and genetic immunodeficiency diseases.

KEY WORDS V(D)J gene rearrangement Genetic immunodeficiency disease Molecular deficiency

免疫的多样性是通过 Igs 和 TCR 可变区的一系列程序性 DNA 重排来实现的,这种重排叫做 V(D)J 重排。这种重排过程在有颌脊椎动物的整个进化过程中高度保守,最早出现在鲨鱼。Igs 和 TCR 基因被组织成分散的 V、D、J 片段簇,所有这些片段都被位于由高度保守的聚合物组成的重组信号系列 (recombination signal sequences, RSSs) 和由 12bp 或 23bp 间隔基因 (spacer) 隔开的九聚体 (nonamers) 两翼。Ig 和 TCR 分子的可变结构域是由新形成的外显子编码。

体内 V(D)J 基因重排 (rearrangement) 是多种分子参与的复杂过程,其分子机制已基本阐明。V(D)J 重组反应可以用图表表示,分为三个部分:首先,重组活化基因 (recombination-activating gene) RAG1 和 RAG2 的表达产物,对不成熟淋巴细胞中重组活化基因的表达具有特异性,并启动这一表达过程。RAG 蛋白指导 RSSs 的重组并引起 RSS 和附近编码片段之间的 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DNA-dsbs), 产生两种类型的末端—编码末端 (coding ends) 和信号末端 (signal ends)^[1-3]。这些广泛表达的因子属于细胞中非同源性末端连接 (nonhomologous end-joining machinery,

NHEJ) DNA 修复元件,能够保证 RAG1/2 诱导的 DNA 损伤的解决^[4]。第二步是 DNA-依赖蛋白激酶 (DNA-dependant protein kinase, DNA-PK) 复合物能够通过结合 Ku70/Ku80 异二聚体形成的调节元件识别 DNA-dsbs, 对 DNA-PK 最新的认识是具有募集和磷酸化 Artemis 的功能^[5], 引起编码末端发夹结构的开放。最后, XRCC4/DNA-ligase IV 复合物自身完成 DNA 修复, (见图 1)。

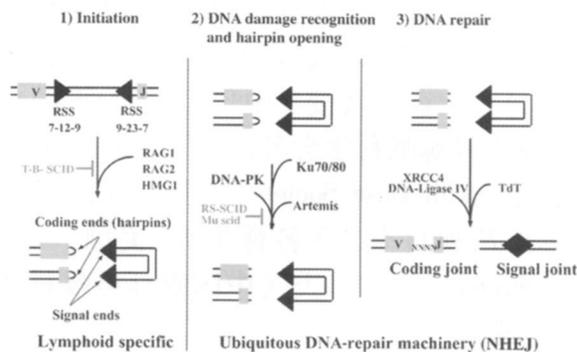


图 1 V(D)J 重组^[6]

活化基因 RAG1 和 RAG2 在 RSS 边界上通过诱导一个 DNA 双链断裂启动 V(D)J 重组,使发夹结构封闭末端和信号末端从染色体上脱离。启动阶段是淋巴特异的。随后的阶段紧接着的是 DNA 修复的非同源末端连接 (NHEJ)。在第二阶段, Ku70-80/DNA-PK 复合物识别 DNA 损伤,并标明细胞 DNA 损伤修复机制。Artemis 是被 DNA-PKcs 复合物招募和磷酸化,引起发夹结构的开放。DNA-dsb 最后被 XRCC4/DNA-ligase IV 复合物修复。RAG1/2 的突变退出 V(D)J 重组的启动阶段,而 Artemis (RS 重症联合免疫缺陷) 或 DNA-PKcs (小鼠重症联合免疫缺陷) 的缺陷可引起发夹结构的不消失,但不影响信号末端的正常处理。

作者单位 1 四川省乐山市红十字会医院检验科

2 复旦大学生物医学研究院发育生物学与出生缺陷研究所

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目 (C060502)

造血系统和免疫系统因其调节细胞分化、细胞增殖和细胞凋亡等组织器官发生的重要过程, 所以是进行生理机制研究的最佳模型。造血系统起源于具有自我更新能力的多能造血干细胞一系列的分子和细胞活动产生不同的细胞系, 并构成造血细胞。就淋巴细胞而言, 其发生过程起源于假定的淋巴祖细胞, 结束于成熟的 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞。在过去 15 年, 人类已认识的 120 种人类免疫系统遗传性疾病中有 75% 是由于特定的免疫缺陷引起。这些疾病影响先天性免疫或淋巴细胞生成、免疫反应和淋巴细胞稳态的通路。根据细胞系和功能 (B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和补体缺陷) 可对免疫缺陷疾病进行图解性划分。一组包括几种不同临床和生物特征的免疫缺陷病构成重症联合免疫缺陷症 (SCID)。SCID 的特征是 T 细胞分化在各级阶段发生严重阻滞, 这些缺陷不仅只限于 T 细胞系, 也影响 B 细胞和 / 或 NK 细胞。十种不同的遗传学病病因被认定引起 SCID, 如图 2 所示。V(D)J 重组缺陷也被认为引起 SCID, 其特征是, 当不讨论 NK 细胞时, T、B 淋巴细胞的成熟发生特定的阻滞。下面分析一下参与 V(D)J 基因重排的分子与免疫缺陷病的关系。

1 RAG 的结构及功能

RAG 包括 RAG1 和 RAG2, 它们是一对非常独特的基因, 最早出现在有齿鱼, 在脊椎动物进化过程中高度保守。在人基因组, 它们以尾对尾的结构形式定位于 11 号染色体 11p13, 其编码区位于单独的一个外显子。通过大量的 RAG 蛋白突变体的研究, 帮助我们确定了 RAG 蛋白的多个功能域。人 RAG1 蛋白全长 1008 个氨基酸残基, 其氨基末端区域 (1-386 氨基酸残基) 有核定位信号, 特别是 4 个碱性区域 B I₁ B I I_a B I I_b B I I_c 是核转运蛋白 SRP1 的靶点。两个锌指结构域 C3HC4 C2H2 参与 RAG1 蛋白的二聚体的形成。RAG1 蛋白的中心区域有两个非常保守的功能域, 其中 392-448 氨基酸残基区域识别重组信号序列 RSS 将 RAG1-RAG2 蛋白复合体锚定在 RSS 区。另一个 504-526 氨基酸残基区域是重组酶活性区域, 与 RAG2 蛋白相互作用功能域定位于 504-1008 氨基酸残基区域, 包含了活性中心和羧基末端区域。人 RAG2 蛋白全长包括 517 个蛋白氨基酸残基, 其活性中心位于氨基末端 1-382 氨基酸残基区域, 其中 1-355 氨基酸残基区域包含 6 个由 50 个氨基酸残基组成的 *kelch/mipp* 重复基序, 它们

介导蛋白-蛋白和蛋白-DNA 相互作用。RAG2 蛋白羧基末端区域非常保守, 可能介导与染色体蛋白之间的相互作用。

2 RAG 与先天性免疫缺陷病的关系

2.1 人类 RAG1/2 突变体 虽然 V(D)J 重组的基本功能是使免疫系统多样化, 但它也构成免疫系统两类主要细胞形成过程中的主要检查点。事实上, RAG1/2 编码基因中的任何一个失活都能够引起 B 细胞和 T 细胞在非常早期的时候发生成熟阻滞, 引起外周血中 T、B 淋巴细胞减少而导致免疫缺陷。当对 SCID 病人的骨髓分析其 Ig 重链 (IgH) 基因重排状态时, 人们开始怀疑是否存在 V(D)J 重组缺陷。人类 T-B-NK + 联合免疫缺陷 (T-B-NK + SCID) 出现在大约 2% 的所有人类 SCID 病例中, 这是一种常染色体隐性遗传。因为完全缺乏 T、B 淋巴细胞, 所以这类病人有相似的临床特征, 即病人在出生后的第一年发生致死性感染。Schwarz 等早在 1996 年就鉴定出一组病人 RAG1/2 基因的突变。自从这次报道以后, 人类其他 RAG1/2 基因突变也相继报道出来。作为一种普遍的规则, 当分析成纤维细胞 V(D)J 重组时, 大多数这些突变能够引起一个重组活性的严重缺乏。这些病人许多突变发生氨基酸替换, 这种替换出现在两种蛋白的关键残基上。

2.2 小鼠的 RAG1/2 缺陷新模型 体外突变发生研究已经明确, RAG1 (aa384-1008) 和 RAG2 (aa1-383) 两种蛋白质的核心区域在 V(D)J 重组实验起始阶段 (DNA 结合和分离) 中是所必需的, 该实验是采用纯化蛋白在试管中以染色体外底物为模板进行的。然而, 在进化中 RAG1/2 非必需区域高氨基酸序列的保守性在 V(D)J 重组过程中有重要的生理作用。与这种观点一致的是, 几个 T-B-SCID 病人有核心区域之外的突变, 也具有与发生核心突变的病人相同的临床和生物学表型^[7], 特别是 RAG2 C 末端的核区域之外含有重要的模体。例如, 细胞周期 RAG2 增加的调控依赖于这种蛋白 (包括 Thr490 一种 CDK 磷酸化底物) 的非必需区域的保守降解信号 (conserved degradation signal), 而这种调控将 V(D)J 重组信号限定在 G1 期。这个区域也含有对于 RAG2 的核定位是重要的模体。因此, 试图推断这个特定结构域虽然不是对染色质环境 (比如染色体的质粒) 之外的 V(D)J 对底物重组的要求所必需的, 但是这个特定的结构域当发生内源性作用时, 对 Ig 或 TCR 是很关键的。事实上, 在内源性 Ig 有效

重排中, RAG1/2 非必需区域的重要作用首先在实验中报道, 并试图补充说明的是 Abelson 前-B 细胞株来自 RAG1/2^{-/-} 小鼠。几个实验室最近通过替换和同源重组在 小鼠中建立了 RAG1/2 突变的新模型, 通过替换和同源重组, 在各自核心区域 (RAG1^{cf}

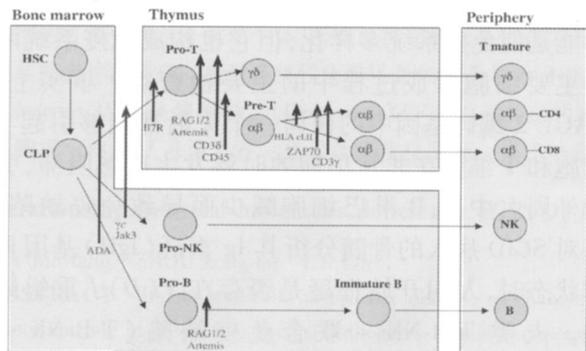


图 2 淋巴细胞发育阻滞引起的免疫缺陷^[6]

淋巴细胞来自一个起源于造血干细胞 (HSC) 的淋巴祖细胞。几个基因的缺陷被确定引起一个或几个淋巴细胞系的阻滞 (垂直的箭头)。当不论及 NK 细胞系时, RAG1/2 或 Artemis 基因的缺陷引起的 V(D)J 重组的缺乏导致 B 细胞和 T 细胞发育的损伤。

和 RAG2^{cf/c} 建立了全长编码序列^[8,10] RAG2^{cf/c} 小鼠。具有比较轻微的免疫表型, 能说明 B 细胞株和 T 细胞株成熟发生的明显损伤^[8,9]。在这些动物中, 发现大约 1/3 的正常 B 细胞数量和接近正常的 T 细胞数量。并发现 IgH 和 TCR 基因重排的缺陷, 这种缺陷主要影响 V 到 DJ 的重组。RAG^{cf/c} 小鼠有相似的表型, 这种小鼠表现出胸腺小体的稍微减少 (1/3 的野生型水平) 和脾 B 细胞 (50% 的野生型水平) 绝对数目减少^[10]。这种 IgH 和 TCR 的重排对 RAG^{cf/c} 小鼠也有影响。明显地, 这些小鼠的表型是没有 RAG1^{-/-} 的小鼠, 有突变的 T-B-SCID 甚至表达缺少 NH2-末端 183 为残基的特定 SCID 病人的表型严重。什么原因导致人和小鼠表型的差异目前仍未可知。

3 Artemis 的结构和功能

3.1 Artemis 的结构 Artemis 是一个由 692 个氨基酸编码的 78kDa 蛋白。蛋白测序表明, Artemis 可以分为三个不同的结构域。由外显子 1-6 编码的前 155 个氨基酸具有与金属 β-内酰胺酶明显的同源性。通过疏水性分析, Artemis 的假想二级结构可以进一步证实这种同源性的存在。金属 β-内酰胺酶折叠蛋白, 也称 B 类 β-内酰胺酶, 是一种首先在细菌中的一大类球蛋白, 参与一些 β-内酰胺环的脱水作用。机体内广泛表达的许多蛋白能够识别金属-

β-内酰胺酶。这些酶具有广泛的底物, 大多数都有酯键和带负电荷, 其中一组参与核苷酸代谢的蛋白质组成, 比如裂解和多聚腺苷酸化特异因子 (cleavage and polyadenylation-specific factor) 的 73kDa 亚单位或者酵母和小鼠 DNA 修复因子 PSO2 和 SNM1。众所周知, Artemis 首先是通过其与 PSO2 同源的松散序列首先被鉴定出来。

3.2 Artemis 在 V(D)J 重组和 DNA 修复中的功能

3.2.1 Artemis 处理 DNA 的发夹结构 在各种引起 V(D)J 重组异常中断的缺陷性 DNA 修复机制的动物和细胞模型中, 电离辐射高度敏感性 SCID (RS-SCID) 和 SCID 小鼠仅仅是这种编码连接损伤分子缺陷的两个例子, 这个结论为 Artemis (DNA-PKcs) 参与 V(D)J 重组过程提供重要依据。在 RAG1/2 产生 DNA-dsb 后, 信号连接出现, 因为 5' 磷酸化平端明显不需要在信号连接重新连接之前作进一步处理。相反, 因为就像 RAG1/2 复合物调节酯基转移反应的直接结果, 编码末端是共价封闭的, 可以形成发夹结构。这些结构 (发夹开放, hairpin opening) 的进一步处理是编码末端再连接在一起的先决条件。基于 RS-SCID 病人和 SCID 小鼠表型的相似性, Ma 等^[12] 在体内外寻找和鉴定 Artemis 和 DNA-PKcs 的相互作用。他们的研究表明 DNA-PKcs 在体外能够磷酸化 Artemis, 而 Artemis/DNA-PKcs 复合物能够产生核酸内切酶的活性, 在体外能够打开 RAG1/2 的发夹结构和处理 5' 和 3' 单链突起。这种活性明显依赖于 Artemis 和 DNA-PKcs 连续的相互作用。发夹结构的出现在 3' 端到顶部, 引起 3' 端突起的产生。这些数据与 M. Schlisel 以前的研究相一致, 表明淋巴造血祖细胞经过 V(D)J 重组以后能够恢复非发夹编码末端, 而且该末端有 3' 突起。Artemis KO 小鼠胸腺细胞的 TCR δ 位点编码末端的发夹结构出现增多的实验可以证实在 V(D)J 重组过程中, Artemis 在体内事实上是分子裂开的发夹结构。

3.2.2 Artemis 在 DNA 修复中的功能

为了解释 Artemis 缺陷的细胞放射敏感性的增加, 有人提出 Artemis 是处理出现 DNA 断裂的其他类型 DNA 末端结构所需要的观点。这种作用可以总结为, 在 DNA-PKcs 存在时, 通过 Artemis 特异的 5' 和 3' 单链突起核酸酶的活性切出单链 DNA^[11]。因此, 这种外切酶活性在 DNA 修复中可以作为一种工具, 正如 V(D)J 重组过程中信号末端的自然形成一样, DNA-PKcs 是 5' 磷酸化钝性 DNA 末端的 DNA 修

复所必不可少的。DNA-PKcs(和 DNA-PKcs)在 $V(D)J$ 重组和 DNA 修复的功能不同可以被 $Artemis^{-/-}$ 和 DNA-PKcs $^{-/-}$ 胚胎干细胞的奇怪结果所证实。 $Artemis^{-/-}$ 和 DNA-PKcs $^{-/-}$ ES 与鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 明显不同, 虽然它们也表现 $V(D)J$ 重组的缺陷, 但它们不表现对电离辐射敏感性的增加。最后 $Artemis$ 不参与 DNA 交联剂引起的损伤, 因为 $Artemis^{-/-}$ MEFs 不对丝裂霉素 c 敏感。

4 $Artemis$ 亚等位基因突变与先天性免疫缺陷病的关系

四个病人被确证为有 $Artemis$ 亚等位基因的突变^[12]。他们中的所有病人都表现严重的淋巴细胞减少症、缺乏 IgA 和出生后反复的肺部和呼吸道感染。TCRV β 的用法是多种多样的, TCR- β 连接是缺乏 N 核苷酸的。这种情形仅仅在末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) $^{-/-}$ 和 Ku80 $^{-/-}$ 小鼠中发现过, 这也表明 $V(D)J$ 重组机制的可能缺陷。事实上, 这些病人都表现细胞对电离辐射的高度敏感 (radiosensitive; RS) 和成纤维细胞 $V(D)J$ 重组的实质性缺陷。 $Artemis$ 基因的测序分析表明, C-末端结构域的平端剩有蛋白质的催化 β -Lact/BCASP 结构域, 因此能与残留的 $V(D)J$ 重组活性具有兼容性, 因此能够产生一些 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。值得注意的是这两个病人患有急性弥漫性 B 淋巴瘤。当考虑到 P53 $^{-/-}$ 的情况时, 该结论明显表明了 NHEJ 缺陷小鼠中前-B 细胞淋巴瘤的出现, 也表明 $Artemis$ 可能作为基因组管理者的角色。这种观点进一步支持 $Artemis$ 亚等位基因病人 ES 细胞和 $Artemis^{-/-}$ 病人的 MEFs 淋巴细胞存在遗传不稳定性^[12]。考虑到 $Artemis$ 作为可能的基因组管理者的角色, 有人认为 $Artemis$ 缺陷可能参与众多恶性肿瘤的发生。

人和小鼠 $Artemis$ 的突变由于在 $V(D)J$ 重组中存在一个缺陷可引起重症联合免疫缺陷。此外, $Artemis$ 突变体的放射敏感性和染色体不稳定性都归因于它的这个 NHEJ 的缺陷。Xiaoshan Zhang 等^[13] 的研究显示, $Artemis$ 缺失的细胞提取物有 NHEJ 缺陷, $Artemis$ 缺陷的细胞在经电离辐射后可有正常的双链断裂 (dsb) 修复动力。然而, 据显示 $Artemis$ 能与已知的细胞周期检查点蛋白发生相互作用, 在细胞经电离辐射或紫外线照射后能够成为检查点激酶 ATM 或 ATR 的磷酸化靶点。与现有的研究存在一致的是, 他们的研究显示 $Artemis$ 是维持正常 DNA 损伤诱导的 G2/M 细胞周期停滞所必需的, 然而 $Ar-$

$temis$ 不与检查点激酶 Chk1 或 Chk2 的上游或下游分子发生相互作用。这些结果表明 $Artemis$ 有细胞周期检查点功能, 也表明在 DNA 损伤后, $Artemis$ 缺陷细胞的放射敏感性和染色体不稳定性是由于细胞周期反应存在缺陷。

$Artemis$ 对 $V(D)J$ 重组起关键作用。 $Artemis$ 的无义突变能引起 T-B-NK + 重症联合免疫缺陷 (SCID), 表现为缺乏免疫球蛋白。与其他形式的 SCID 一样, $Artemis$ 缺陷的病人在婴儿期早期出现病毒和肺囊虫肺炎、持续性病毒性腹泻和生长不足。这些病人的骨髓细胞和成纤维细胞表现出对电离辐射细胞敏感性增加。因为 $Artemis$ 的亚等位基因突变, 有必要进一步描述这两种临床表型。首先, 婴儿表现出淋巴结病、肝脾肿大、红皮病、脱发、除 IgE 升高以外的无 γ 球蛋白血症、T 细胞增多和伴有呼吸和胃肠道症状的 B 细胞缺乏和长势不能^[14]。这一系列症状叫做 Omen 综合征, 类似 RAG 突变的亚等位基因突变的临床表现。病人皮肤活组织检查表现出与移植抗宿主病一致的组织病理学模式。第二, 病人婴儿期晚期表现出渐进性联合免疫缺陷 (CID), 其特点是反复肺炎或胃肠道感染, T 和 B 淋巴细胞减少, 低丙种球蛋白血症和自发性免疫细胞减少^[15-16]。一些表现出对 EB 病毒相关的 B 细胞淋巴瘤^[15]。有趣的是, 这些病人有染色体 7: 14 倒位和易位, 没有特异的小头畸形的易位特征。 $Artemis$ 不是生存能力所必需的, 因为许多 RS-SCID 病人完全失去功能性等位基因。人类 $Artemis$ 缺陷能特异地影响编码连接的形成; 信号连接是备用的。有趣的是, 虽然一些 $Artemis$ 缺陷小鼠表现出连接形成的缺陷, 然而一些小鼠又能够产生含有正常编码连接的淋巴细胞, 这表明新的因子在开放发夹结构中间体起重要作用。

5 DNA 连接酶 IV (DNA-ligase IV) 的缺陷与免疫缺陷病的关系

缺乏 DNA-ligase IV 或 XRCC4 的小鼠在胚胎发育过程中因为大量的神经元的凋亡而不能存活下来, 因为这些基因发生失活引起 $V(D)J$ 重组的中断。DNA-ligase IV 和 XRCC4 因此不仅是 $V(D)J$ 重组而且是生存发育能力所必需的。M. O Driscoll 等^[17] 发现了 DNA-ligase IV 基因中的几个亚等位基因突变的例子, 受累病人表现出全血细胞减少、生长迟缓和明显的小头畸形。Le Deist 等^[6] 已经确诊了两个与生长迟缓和头畸形有关的严重儿童期免疫

缺陷病人,在他们中发现了 DNA-*ligase IV* 基因的杂合子突变。已经发表的 DNA-*ligase IV* 基因突变包括催化部位的 R278H 替换和 G469E 错义突变以及无义突变 (R580X 和 R814X),这些突变引起了含有两个 BRCT 模体的区域的蛋白质 C 末端平截。以前的研究表明这个区域是与 XRCC4 的相互作用所必需的。LIG4 病人的细胞在 DNA-dsb 修复上是有缺陷的。然而,成纤维细胞 *V(D)J* 重组的编码连接的形成未受完全影响。虽然 LIG4 病人的 TCR- α 和 TCR- β 的连接处不表现任何严重的异常。信号连接的精确度的下降是这些病人 DNA-*ligase IV* 相关的 *V(D)J* 重组缺陷的唯一标志。这些研究表明 LIG4 病人的突变不直接影响 *V(D)J* 重组,而是影响其他特定生理过程引起的 DNA 损伤修复,比如在淋巴细胞成熟过程中密集存在的细胞增殖和免疫反应中。在各种 KO 的情况下,比如 BRCA^{-/-}, DNA 修复因子除了在 *V(D)J* 重组过程,还有在免疫系统的发育和维持过程的关键作用以前也受到过重视。

已经确证的四个 DNA 连接酶缺陷的病人表现出小头畸形、生长迟缓、生长不足、淋巴细胞减少、低丙种球蛋白血症和反复感染^[18]。其中三个病人有 T-B-NK+ RS-SCID,他们中所有人有小头畸形和渐进性联合免疫缺陷 (CID) 表型,其中一个有 T 细胞急性淋巴细胞白血病^[19-20]。这些病人到目前为止没有染色体 7:14 倒位和易位。这些病人的表型介于正常人和 RS-T-B-NK+ SCID 的表型之间。新发现的 DNA 连接酶缺陷的病人与 AT 缺陷病人的特点存在相同之处。DNA 连接酶 IV 的绝对缺陷可导致小鼠胚胎的死亡。LIG4 缺陷的成纤维细胞 *VDJ* 重组分析实验可以看到 *VDJ* 重组的损伤,即编码和信号连接形成正常的频率,但是编码和信号连接形成的保真性受损,并有明显的编码末端再接合 (coding-end rejoining) 的保真性失真^[20-21]。这些体外的表现没有临床免疫缺陷严重,表明 DNA 连接酶 IV 是淋巴细胞形成过程中必需的,可能参与修复淋巴细胞增殖过程中的 DNA 损伤。

6 Cemunos-XLF 缺陷与免疫缺陷病的关系

对淋巴细胞形成关键的第 3 个基因最近也被鉴定出来。在 T-B-NK+ RS-SCID 病人中没有发现一个已知的蛋白参与 DNA-DSB 修复,这表明新的因子是 NHEJ 和 *VDJ* 重组所需要的^[22]。这种新的因子叫 Cemunos-XLF,与 XRCC4/DNA 连接酶 IV 复合物发生相互作用,在 7 个病人中已经发现有其缺

陷。前两个病人虽然有 T、B 细胞数的缺乏,但有 NK 细胞数的减少^[22],随后的 5 个病人有 SCID 表型。所有这些病人与最初的家系有相似的淋巴细胞表型,但是新增了 IgA 和 IgG 低水平的特点。其中两个病人有 IgM 水平的增高,表明 Cemunos-XLF 在交错转换重组 (cross switch recombination CSR)。一些病人表现出小头畸形,两个病人都发生过反复感染机会。在这两个中虽然没有发现过染色体 7:14 易位,却发现了几个染色体的改变,目前还没有发现这些病人患有淋巴瘤。

与对照相比,这些病人中体外编码和信号连接形成减少,伴有编码连接中核酸的丢失。有趣的是,这些病人信号连接保真性受到严重损害,并具有 LIG4 缺陷病人的特征^[23]。这些病人的 *V(D)J* 重组缺陷没有 Artemis 缺陷的 RS-SCID 病人严重,也可能说明这些病人为什么存在 T、B 细胞数目减少。正如 LIG4 缺陷病人的体外研究结果没有临床免疫缺陷严重,表明在远离 *V(D)J* 重组阶段的淋巴细胞形成过程中,Cemunos-XLF 也是必需的。其他临床异常包括骨畸形和肾下垂,一个病人表现出神经发育迟缓,与 DNA 连接酶 IV 缺陷存在一些相同的特征。

展望

目前,没有人应用纯的 *V(D)J* 重排这些因子在试管中使 *V(D)J* 重排形成编码连接产物。因此,我们对整个重组反应的概况不是全面了解。虽然, DNA 损伤特异诱导的 γ H2AX 的磷酸化形成在发生 *V(D)J* 重组的 TCR α 的 DNA 修复病灶 (DNA repair foci) 上可以看到,小鼠中 H2AX 的靶向缺失并不能防止 *V(D)J* 重组发生。如果考虑 *V(D)J* 重组中存在可能活性的丢失,那么应当考虑一下 DNA 编码末端的 DNA 聚合酶。DNA 聚合酶 μ (Polymerase μ , Pol μ) 事实上参与 *V(D)J* 重组,因此发现它与 ku80 和 DNA-*ligase IV* /XRCC4 复合物有关。Pol μ 缺陷小鼠在 T 细胞系形成中不表现任何免疫缺陷,但它们具有一个幼稚的再循环脾 B 淋巴细胞区域的特定缺陷^[24]。就在最近, TdT 和酵母 DNA 修复因子 PSO4 的人类同序物 (PSO4 参与酵母 DNA 交联的修复) 被鉴定出来^[25]。虽然还没有其他数据支持这一假说,这使得有好的候选因子参与 *V(D)J* 重组。这种还未鉴定的 *V(D)J* 重组因子存在的可能性的最有力的支持证据来自人类免疫状况的分析。Dai 等^[26] 报道一个病例,该病人淋巴细胞的明显减少与

一个还未鉴定的基因中存在导致放射敏感性增加的缺陷有关。因为编码频率和成纤维细胞信号连接形成以及信号连接失真性的增加,而且体外分析显示这个病人的细胞提取物不能促进末端连接的活性。目前存在的一个主要困难就是如何定义和临床及生物学特征相关的特定筛选标准,以便使有更好的候选基因供进一步分析。

参考文献

- [1] Gellert M, V(D)J recombination: rag proteins, repair factors and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 101-132.
- [2] Brandt VL, Roth DB. A recombinase diversified: new functions of the RAG proteins. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 224-229.
- [3] Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 2002, 109: S45-S55.
- [4] Haber JE. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 2000, 16: 259-264.
- [5] Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, et al. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 2002, 108: 781-794.
- [6] LeDeist F, Poincignon C, Moshous D, et al. Artemis sheds new light on V(D)J recombination. *Immunological Reviews*, 2004, 200: 142-155.
- [7] Vilka A, Sobacchi C, Notarangelo LD, et al. V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood*, 2001, 97(1): 81-88.
- [8] Liang HE, Hsu LY, Cado D, et al. The 'dispensable' portion of RAG2 is necessary for efficient V-to-DJ rearrangement during B and T cell development. *Immunity*, 2002, 17: 639-651.
- [9] Akamatsu Y, Monroe R, Dudley DD, et al. Deletion of the RAG2 C terminus leads to impaired lymphoid development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(3): 1209-1214.
- [10] Dudley DD, Sekiguchi J, Zhu C, et al. Impaired V(D)J recombination and lymphocyte development in core RAG1-expressing mice. *J Exp Med*, 2003, 198(9): 1439-1450.
- [11] Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, et al. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 2002, 108: 781-794.
- [12] Moshous D, et al. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *Clin Invest*, 2003, 111: 381-387.
- [13] Xiaoshan Zhang, Janice Succu, Zhaohui Feng, et al. Artemis Is a Phosphorylation Target of ATM and ATR and Is Involved in the G2M DNA Damage Checkpoint Response. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 2004, 24: 9207-9220.
- [14] Ege M, Ma Y, Manfras B, et al. Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood*, 2005, 105: 4179-4186.
- [15] Moshous D, Pannetier C, de Chasseval R, et al. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest*, 2003, 111: 381-387.
- [16] Evans PM, Woodbine L, Riball B, et al. Radiation induced delayed cell death in a hypomorphic Artemis cell line. *Hum Mol Genet*, 2006, 15: 1303-1311.
- [17] O'Driscoll M, Cersaletti KM, Girard PM, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell*, 2001, 8(6): 1175-1185.
- [18] O'Driscoll M, Cersaletti KM, Girard PM, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell*, 2001, 8: 1175-1185.
- [19] Beir-Omran T, Cersaletti K, Concannon P, et al. A patient with mutations in DNA Ligase IV: clinical features and overlap with Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet A*, 2005, 137: 283-287.
- [20] Enders A, Fisch P, Schwarz K, et al. A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV. *J Immunol*, 2006, 176: 5060-5068.
- [21] Buck D, Moshous D, de Chasseval R, et al. Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur J Immunol*, 2006, 36: 224-235.
- [22] Dai Y, Kyseka B, Hanakahi LA, et al. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2462-2467.
- [23] van der Burg M, van Veelen LR, Verkaik NS, et al. A new type of radiosensitive T-B-NK+ severe combined immunodeficiency caused by a LIG4 mutation. *J Clin Invest*, 2006, 116: 137-145.
- [24] Bertocci B, De Sanctis A, Berek C, et al. Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*, 2003, 19: 203-211.
- [25] Mahajan KN, Mitchell BS. Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10746-10751.
- [26] Dai Y, Kyseka B, Hanakahi LA, et al. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2462-2467.

[本文编辑] 吴超群