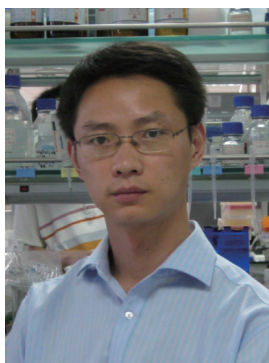


DOI: 10.13376/j.cbbs/2014166

文章编号: 1004-0374(2014)11-1172-04



刘 聪 教授

刘聪, 四川大学特聘教授, 华西第二医院基因组稳定性实验室主任, 教育部新世纪人才。多年来从事 DNA 损伤应答的分子机制的研究, 在 *Genes Dev*、*EMBO J* 和 *J Neurosci* 等杂志上发表论文近 20 篇。近来发现泛素连接酶 CRL4 在染色质重塑、同源重组和乙肝相关肝癌发生过程中的重要作用。研究方向: 主要结合裂殖酵母、动物细胞和临床标本研究细胞基因组损伤后的细胞应答、基因组不稳定性相关疾病以及肿瘤放化疗致敏机制。

DNA双链断裂修复的选择性调控机制

唐子执, 刘 聪*, 曾 鸣*

(四川大学华西第二医院, 成都 610041)

摘 要: 在各种 DNA 损伤中, DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 是最为严重的一种, 快速准确地修复 DSB 对维持基因组稳定性起着至关重要的作用。真核生物细胞通过一系列复杂的信号转导途径激活对 DSB 的修复, 其中最为重要的是同源重组和非同源末端连接机制。最近的研究表明, 这两种方式在 DSB 修复的早期是相互竞争的关系, 其选择在很大程度上受到 53BP1 及同源蛋白质的调控。将讨论 53BP1 作为 DSB 修复途径的核心因子, 在染色质水平整合 BRCA1、CtIP 等修复因子和多种组蛋白修饰构成的信号途径, 介导同源重组和非同源末端连接通路选择的分子机制。

关键词: DNA 双链断裂; 53BP1; 同源重组; 非同源末端连接

中图分类号: Q343

文献标志码: A

Pathway choice for DNA double-strand break repair

TANG Zi-Zhi, LIU CONG*, ZENG Ming*

(West China Women's & Children's Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Double-strand break (DSB) is the most serious one in all kinds of DNA damage. Rapid repair of DSB is essential for genome stability. In eukaryotic cells, DSB repair is activated via a series of signal transduction, and homologous recombination and non-homologous end joining are most important. Recent research shows that the two pathways are competitive at the early period of DSB repair, the choice between them is largely regulated by 53BP1 and its homologous proteins. This review will discuss the novel mechanism that 53BP1, as a key factor in DSB repair, integrates the signal pathway including BRCA1/CtIP and multiple histone modifications, thereby regulating the choice between homologous recombination and non-homologous end joining.

Key words: DNA double-strand break; 53BP1; homologous recombination; non-homologous end joining

收稿日期: 2014-10-08

*通信作者: E-mail: congliu@scu.edu.cn (刘聪); tom1989ul@163.com (曾鸣)

基因组 DNA 作为真核生物最重要的遗传物质, 其分子结构的完整和稳定性对细胞的存活及行使正常生理功能具有决定性作用。DNA 的化学结构频繁受到各种外源及内源性毒理因子的攻击, 改变遗传信息的高保真传递过程, 破坏基因组的稳定性。在各种 DNA 损伤中, DNA 双链断裂 (DSB) 是最为严重的一种, 它可以触发细胞永久性的生长停滞或细胞死亡^[1-2]。真核生物细胞通过一系列复杂的信号转导通路激活 DNA 损伤检验点, 向 DNA 断裂位点招募损伤修复蛋白质, 消除 DNA 损伤对基因组稳定性的破坏作用。这些发生在 DNA 和染色质水平的级联信号传递反应构成了 DSB 应答机制^[3-4]。

同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 是 DSB 应答机制中两条重要的修复通路。前者需要基因组同源序列作为模板进行配对修复, 其修复过程的早期需要形成单链 DNA(ssDNA) 以完成同源序列的搜寻和链侵入; 而后者则是直接将 DNA 断裂端通过形成触点 (synapse) 和 DNA 连接酶 4 的连接反应完成^[5-6]。在整个细胞周期中, HR 和 NHEJ 的功能被严密地调控, 这两种修复途径之间的适当选择对于 DSB 修复和维持基因组稳定性至关重要^[5-8]。最近的研究表明, 从酵母到哺乳动物细胞, 同源重组和非同源末端连接通路存在直接的竞争关系, 调控这种通路选择的分子机制在进化中高度保守。

1 53BP1在DSB修复通路选择性机制中的作用

最近研究表明, p53 结合蛋白 53BP1 是参与损伤修复的核心蛋白因子, 能够整合 DSB 修复蛋白质群和组蛋白修饰在染色质水平的交互调节机制, 对于 DSB 修复通路的选择极为重要^[3,7-8]。53BP1 蛋白由 1 972 个氨基酸残基组成, 具有多个能与 DSB 修复机制相关蛋白进行结合的结构域及重要的磷酸化位点, 如 BRCA1 羧基端结构域 (BRCT) 及 N 端附近 28 个丝氨酸或苏氨酸磷酸化簇。53BP1 在 DSB 修复中充当重要的分子支架, 招募与 DSB 相关修复蛋白到损伤位点^[9]。这是 53BP1 参与修复途径选择的重要分子基础^[4,9]。

目前关于 53BP1 如何精确调节 NHEJ 及 HR 两种修复途径选择的机制尚未定论, 但普遍认为这种机制与 53BP1 通过保护 DSB 断裂处不受到 DNA 末端切割机制的作用, 避免 3' 端 ssDNA 的产生, 从而抑制 HR 修复途径有关^[10]。更为重要的是, 53BP1

介导的通路选择与乳腺癌基因编码的蛋白 BRCA1 密切相关。目前对于 53BP1 及 BRCA1 如何调节 HR 和 NHEJ 两种修复通路选择的具体机制的解释, 较为公认的一种理论认为当 DSB 形成时, 首先通过由 MRE11、RAD50、NBS1 蛋白共同组成的 MRN 复合体结合在断裂点, CtIP 蛋白随之与 MRN 结合, 并产生乙酰化位点, 促进 53BP1 在断裂点结合 Lys15 位点被泛素化的组蛋白 H2A, 同时与组蛋白 H4 被双甲基化的 Lys20 残基结合, 在同一核小体上形成 53BP1-H2A-H4 的镜像二聚体^[11-12]。该二聚体形成之后, 53BP1 的 N 端形成 Ser/Thr 磷酸化簇, 与 PTIP 及 RIF1 直接或间接结合, 将其招募至染色质上。一旦这种 53BP1-PTIP-RIF1 蛋白质复合体稳定形成, 将保护断裂点不会被外切酶切割形成 ssDNA, 从而促使修复途径进入 NHEJ^[10,13-14]。而在另一种情况下, SIRT6 蛋白将 CtIP 蛋白上乙酰化位点去除, CtIP 在细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 作用下产生多个磷酸化位点并与 BRCA1 结合, 阻碍 53BP1-PTIP-RIF1 复合物与染色质的结合, 同时组蛋白 H4 的 Lys16 在 KAT5 的作用下被乙酰化, 使 53BP1 更难以与组蛋白 H4 结合形成镜像二聚体, 进一步抑制了 53BP1 在断裂位点处的富集, 因此使得修复机制进入 HR 途径^[10,15]。由此可见, BRCA1 可以竞争性地抑制 53BP1 与断裂位点区域的结合, 使修复途径偏向于 HR 途径, 其深层次的分子机制是二者对损伤位点上募集的 CtIP 等修复因子和组蛋白修饰的竞争性结合决定了 DSB 修复途径的选择。

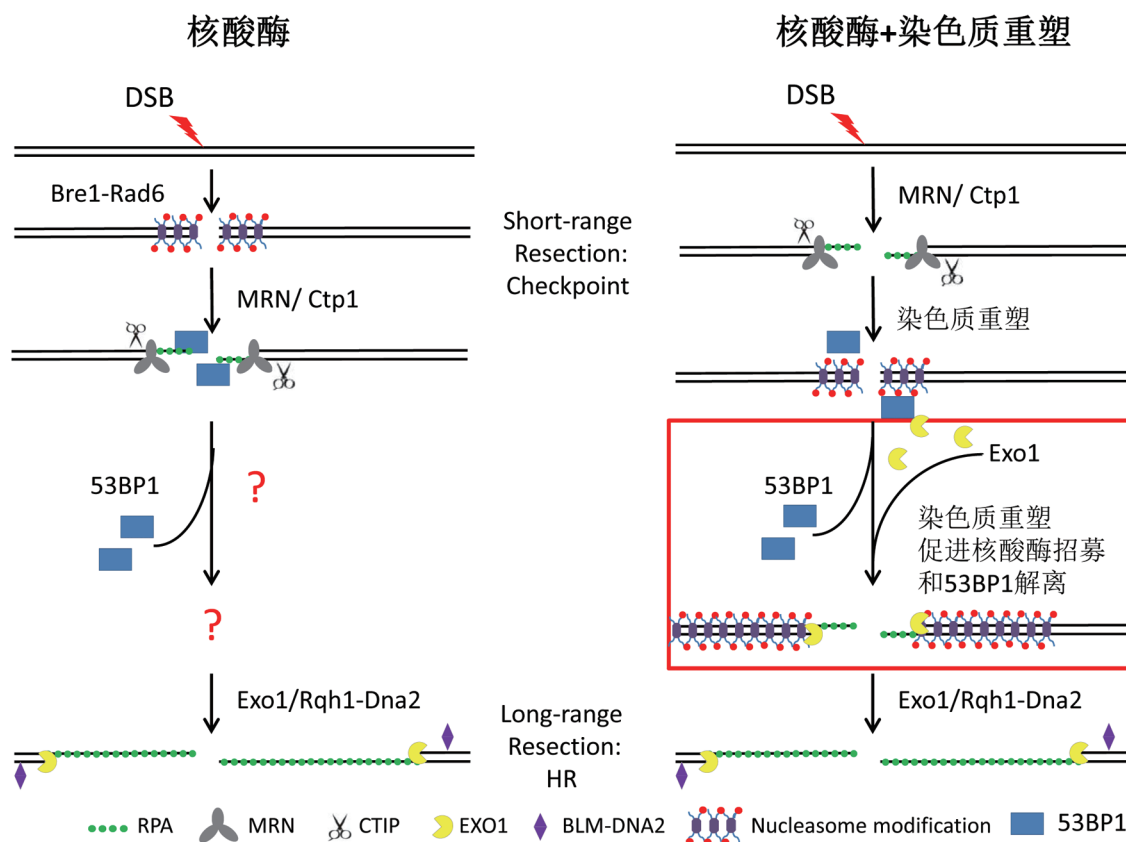
英国萨塞克斯大学的 Jeggo 课题组对 53BP1 及 BRCA1 在修复途径中的选择机制提出了新的理论^[16]。通过观察比较 53BP1 在不同条件下的放射线诱导的灶点 (IRIF) 体积及形态变化, 该理论提出一种解释: 53BP1 结合在 DSB 位点之后, 通过 BRCA1 和 POH1 去泛素化酶共同作用, 使 53BP1 二聚体与 RPA80 共同形成的复合物构象发生变化, 与染色体的结合变得松动, 从而脱离结合位点, 使得断裂位点暴露, 促进 5'→3' 的切除反应进行, 促使修复过程进入 HR 途径。在缺乏 BRCA1 时, 53BP1 与 RPA80 在断裂处形成的复合物不能从 DSB 位点上脱离, 因此, 修复过程将进入 NHEJ 通路。该理论很好地解释了 53BP1 在不同条件下的 IRIF 体积及形态变化, 但是对于 BRCA1 是如何与 POH1 协同作用使 53BP1-RPA80 复合物脱离结合位点, 仍然需要更多深入研究。

在以上模型中, 仍然存在许多问题无法解释。例如, RIF1 如何与 53BP1 的磷酸化位点结合; 与 CtIP 结合后的 BRCA1 是通过什么途径阻碍 53BP1-PTIP/RIF1 复合物募集到染色体上。这些重要机制仍待进一步的研究。

2 染色质重塑涉及DSB修复通路的选择

在染色质水平上, 关于 53BP1 对 HR 和 NHEJ 选择作用的认识也在进一步加深。目前为止, 利用遗传学或体外生化反应针对 DSB 回切所需核酸酶的研究较为深入, 但是, 考虑到体内 DNA 双链由组蛋白紧密包裹为核小体而非裸露状态, 单纯的核酸酶模型不能反应体内 DSB 回切的真实情况。因此, 探寻核酸酶如何在染色质状态下迁移数十 kb 进行 DNA 链解反应是目前表观遗传学和 DNA 损伤领域的一个重要问题。最近, 有实验室在芽殖酵母中发现, 依赖于染色质重塑因子 Fun30 的染色质修饰对同源重组修复过程所必需的 ssDNA 的形成有直接的促进作用^[17-18]。DNA 损伤后, Fun30 迅

速结合到 DSB 位点, 调控 Exo1 和 BLM1^{Sgs1} 在 DSB 的定向招募, 从而促进长距离 5'→3' 回切过程; 在 Fun30 缺失的细胞中, ssDNA 形成所需的核酸酶不能有效招募, DSB 断端不能形成足够长的 ssDNA, 导致同源重组修复因子, 如 Rad51 等都不能及时地结合上 DSB^[18]。有意思的是, Fun30 的实际功能是促进 ssDNA 向远处延伸, 而不是启动 MRN 等核酸酶对 DSB 末端的切割, DSB 周围的 ssDNA 形成实际上并不受影响。造成这种同源重组修复缺陷的原因是在 Fun30 缺陷的情况下, 53BP1 同源蛋白 Rad9^{53BP1} 在 DSB 位点过度富集, 导致核酸酶不能有效招募以形成足够长度的 ssDNA^[19]。Fun30 的机制研究揭示了染色质修饰对 DSB 修复的重要调控作用, 是表观遗传机制调控同源重组修复的重要突破。该研究还说明, DSB 的早期处理加工和通路选择是以 53BP1 为核心的一系列修复蛋白在 DSB 位点竞争结合, 进而调控剪切 DNA 的核酸酶和染色质重塑共同作用的结果 (图 1)。



核酸酶MRN复合体和Ctp1对DSB末端进行短距离加工, 而Exo1/Rqh1-Dna2则具有长距离核酸降解的能力。在染色质状态下, 染色质重塑因子对核酸酶介入、53BP1介导的选择机制的完成起着重要的作用。

图1 DNA双链断裂的早期处理过程, 经典的核酸酶模型(左)和染色质重塑模型(右)

最近, 我们实验室利用裂殖酵母作为研究对象, 发现组蛋白 H2B 的单泛素化也可以抑制 NHEJ, 促进 HR (文章投稿中)。调控 DSB 附近 H2B 单泛素化的关键蛋白质是我们新鉴定的染色质重塑因子 CRL4^{Wdr70}。在 CRL4^{Wdr70} 或 H2B 单泛素化缺失的情况下, 53BP1 同源蛋白 Crb2^{53BP1} 过度招募到 DNA 双链断裂位点, 特异性地抑制长距离核酸外切酶 Exo1 对 DSB 附近 DNA 的加工, 从而阻碍 ssDNA 的形成和同源重组的进行。CRL4^{Wdr70} 的这种功能似乎在高等生物中是保守的。我们进一步对乙肝病毒 (HBV) 的研究发现, 乙肝病毒编码的癌基因 HBx 干扰 CRL4^{Wdr70} 泛素酶复合体的组装, 从而强烈地抑制该酶介导的 H2B 单泛素化、复制蛋白 RPA 和 RAD51 招募等同源重组的核心分子事件, 从而阻碍 HBV 宿主细胞染色质重塑机制和 DNA 损伤修复的进行。更有意义的是, 过表达 CRL4^{Wdr70} 可以有效地在裸鼠体内抑制 HBV 阳性细胞系的肿瘤形成, 证明该泛素酶是一个乙肝相关肝癌的有效抑制因子。鉴于中国人群中原发性肝癌患者的 90% 以上为乙肝病毒携带者, 我们的工作可能回答了一个长期悬而未决的临床问题, 即为什么 HBV 是原发性肝癌最重要的致癌因素之一。

总之, DSB 的有效修复对维持细胞正常生理活动具有重要意义。在真核生物的进化过程中, 53BP1 扮演了核心的角色, 对 HR 和 NHEJ 通路进行严密的选择性调控, 促使 DNA 修复因子和组蛋白修饰等染色质水平上的分子事件有条不紊地进行, 保证了遗传信息的高保真传递及基因组的稳定性^[20]。

[参 考 文 献]

- [1] Bennett CB, Lewis AL, Baldwin KK, et al. Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(12): 5613-7
- [2] Sandell LL, Zakian VA. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*, 1993, 75(4): 729-39
- [3] Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 7-18
- [4] Panier S, Ichijima Y, Fradet-Turcotte A, et al. Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 383-95
- [5] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211
- [6] Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 113-39
- [7] Daley JM, Sung P. 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(8): 1380-8
- [8] Chapman JR, Sossick AJ, Boulton SJ, et al. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 15): 3529-34
- [9] Panier S, Durocher D. Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(10): 661-72
- [10] Tang J, Cho NW, Cui G, et al. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(3): 317-25
- [11] Gatti M, Pinato S, Maspero E, et al. A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. *Cell Cycle*, 2012, 11(13): 2538-44
- [12] Mattioli F, Vissers JH, van Dijk WJ, et al. RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*, 2012, 150(6): 1182-95
- [13] Chapman JR, Barral P, Vannier JB, et al. RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 858-71
- [14] Zimmermann M, Lottersberger F, Buonomo SB, et al. 53BP1 regulates repair using rif1 to control 5' end resection. *Science*, 2013, 399(6120): 700-4
- [15] Feng L, Fong KW, Wang J, et al. RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem*, 2013, 288(16): 11135-43
- [16] Kakarougkas A, Ismail A, Katsuki Y, et al. Co-operation of BRCA1 and POH1 relieves the barriers posed by 53BP1 and RAP80 to resection. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(22): 10298-311
- [17] Eapen VV, Sugawara N, Tsabar M, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* chromatin remodeler Fun30 regulates DNA end resection and checkpoint deactivation. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(22): 4727-40
- [18] Thomas C, Raphaël L, Nozomi T, et al. The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodelers promote DNA end resection. *Nature*, 2012, 489(7417): 581-4
- [19] Chen X, Cui D, Papusha A, et al. The Fun30 ATP-dependent nucleosome remodeler promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature*, 2012, 489(7417): 576-80
- [20] Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, et al. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 872-83