

·综述·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2016.02.013

DNA 双链断裂修复过程中的重要蛋白 53BP1

张敏¹, 范久波¹, 邵金辉¹, 胡祁生¹, 于弘钧^{2*}

(1. 湖北文理学院 医学院, 中国湖北 襄阳 441053; 2. 纽约州立大学石溪分校 医学院, 美国纽约 11974)

摘要: DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)修复对于保证基因组完整性以及维持细胞的平衡稳定性起着关键作用。p53 结合蛋白 1(p53-binding protein 1, 53BP1)是针对产生的双链断裂损伤做出反应的重要调控因子。目前, 研究人员对于 53BP1 被招募到受损的染色质上的过程, 以及 53BP1 在 DSBs 修复过程中阻止同源重组(homologous recombination, HR)的同时推动非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)的过程, 已经有了新的认识。并且, 近期的研究结果启发科学家们提出了一种新的模型, 即 53BP1 的招募需要直接识别 DSBs 特异性的组蛋白密码, 而 53BP1 发挥作用时的通路选择则与 BRCA1 蛋白的拮抗作用有关。结合近年来有关 53BP1 的研究进展, 主要综述了 53BP1 的结构与功能特点, 其作为调控因子在 DSBs 修复过程中发挥的作用, 以及 53BP1 达到有效聚集的方式。

关键词: DNA 双链断裂; p53 结合蛋白 1; 通路选择; 标志识别

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)02-0162-04

53BP1: a Key Protein in Repair of Double-Strand Breaks

ZHANG Min¹, FAN Jiu-bo, SHAO Jin-hui¹, HU Qi-sheng¹, YU Hong-jun^{2*}

(1. School of Medicine, Hubei University of Art and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China;

2. School of Medicine, Stony Brook University, New York 11974, USA)

Abstract: The repair of DNA double-strand breaks (DSBs) is crucial to preserve genomic integrity and maintain cellular homeostasis. p53-binding protein 1 (53BP1) is an important regulator in response to DSBs. So far, new insights have been gained into the mechanism underlying the recruitment of 53BP1 to damaged chromatin. Also, new evidences have been revealed how 53BP1 promotes non-homologous end-joining-mediated DSBs repair while preventing homologous recombination. In addition, based on recent studies, the new model has been put forward that 53BP1 recruitment requires the direct recognition of a DSBs-specific histone code and its pathway choice is mediated by mutual antagonism with BRCA1. Here, the structural and functional characteristics of 53BP1 are reviewed and an overview of its role as a mediator in DSBs repair pathway is presented, as well as its recruitment to damaged chromatin.

Key words: DNA double-strand breaks (DSBs); p53-binding protein 1 (53BP1); pathway choice; mark recognition

(*Life Science Research*, 2016, 20(2): 162~165)

准确地复制与传递遗传物质是生命存活的基础。然而, 细胞却在不断地遭受来自体内外的各种导致 DNA 损伤的因素, 这些因素往往会破坏 DNA 的完整性, 影响基因组的稳定性^[1]。在 DNA 损伤类型中, 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)是公认危害最大的一种。仅一个未被修复的 DSB

就足以引发细胞永久性的生长停滞及死亡^[2]。DSBs 是造成染色质重排的重要因素, 这些基因组的重构具有激活癌基因或者阻遏肿瘤抑制因子的作用, 从而引起肿瘤的恶性转化。为应对具有危害性的 DSBs, 细胞通过组装一个复杂的信号传递网络来协调 DNA 损伤检验点的激活及染色质重排

收稿日期: 2015-03-16; 修回日期: 2015-05-12

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2015CFC801); 湖北省卫生和计划生育委员会一般项目(WJ2015MB189); 湖北文理学院科研启动金项目(20131208)

作者简介: 张敏(1982-), 女, 湖北襄阳人, 博士, 讲师, 主要从事分子肿瘤学研究, Tel: 0710-3592275, E-mail: zmhbuas@outlook.com; * 通讯作者: 于弘钧(1982-), 男, 湖北襄阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事生物大分子结构与功能研究, Tel: 0710-3591126, E-mail: hyu@bni.gov.

等相关的DNA修复反应,这一信号传导网络被称为DSBs反应^[3]。

p53结合蛋白1(p53-binding protein 1, 53BP1)作为一个重要的调控因子参与到DSBs反应的信号传递中。53BP1是基于染色质的DSBs信号传导过程中的关键蛋白,它与肿瘤抑制蛋白p53有相互作用^[4]。由于在DSBs信号传递、细胞检验点激活以及DSBs修复过程中具有多种作用,53BP1基因毫无悬念地被证实是一种肿瘤抑制基因^[5]。本文综述了53BP1是如何作为调节元件和效应元件参与到DSBs反应中,并进一步根据目前新的发现,阐明53BP1是怎样特异性地定位到受损染色质上以及如何调控不同DSBs修复通路来维持基因组的稳定性。

1 53BP1具有作为DSBs信号传导调节元件的特定结构

53BP1由1972个氨基酸组成,它拥有可以和很多DSBs反应蛋白发生相互作用的表面。它的结构元件包括BRCA1羧基端重复序列(BRCA1 carboxy-terminal, BRCT)、串联tudor序列、28个氨基酸组成的丝氨酸/苏氨酸-谷氨酰胺(Ser/Thr-Gln, S/T-Q)位点,这些结构元件可以全部或部分被ATM磷酸化。

1.1 为DSBs反应相关因子提供脚手架结构

53BP1在受损染色质上具有多种功能。首先,53BP1可以作为脚手架招募其他的DSBs反应蛋白到损伤染色质上。其中有两种蛋白必须依赖于53BP1才能聚集在DSBs损伤位点,一个是染色质调节子EXPAND1,它以不依赖磷酸化的形式与BRCT结构域作用^[6];另一个是RIF1,它与53BP1上被ATM激酶磷酸化的残基发生作用。

1.2 促进检验点信号传递

53BP1的另一个功能是放大ATM的活性效应以应对低水平的DNA损伤。53BP1通过其BRCT结构域与MRN复合体中RAD50直接相互作用,将ATM招募至DNA损伤处,进而激活ATM的活性。如果53BP1没有定位到受损染色质上,将导致ATM激酶对p53、CHK2及BRCA1等蛋白的磷酸化水平明显下降,并引发G2-M检验点的缺陷和基因组的不稳定^[7,8]。

1.3 影响修复通路的选择

真核细胞有两种主要的修复途径应对DSBs损伤:非同源末端连接(non-homologous end-join-

ing, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)。NHEJ直接重新连接被切断的DNA受损末端,HR则需要大段一致或高同源的DNA序列作为修复的模版^[9]。这两种途径的标志区别在于它们是否需要切割DNA末端:HR需要在DSBs位点附近做较大范围的切割,制造出3'单链突出端;NHEJ在遇到切割的DNA末端时效率则会明显下降。在不同的细胞周期中,DNA末端切割有不同的调控,这也是细胞选择哪种DSBs修复通路的决定因素。近几年的研究表明53BP1是DSBs修复通路选择的决定因子^[3]。在细胞周期的G1期,53BP1可以保护DSBs末端不被DNA末端切除机器所切割,从而促进NHEJ对DSBs的修复。由于53BP1在NHEJ过程中发挥的重要作用,使得它在获得性免疫反应中也占据非常重要的地位。缺失53BP1可能导致明显的抗体转换重组的缺陷^[10]。

2 53BP1发挥作用的通路过程

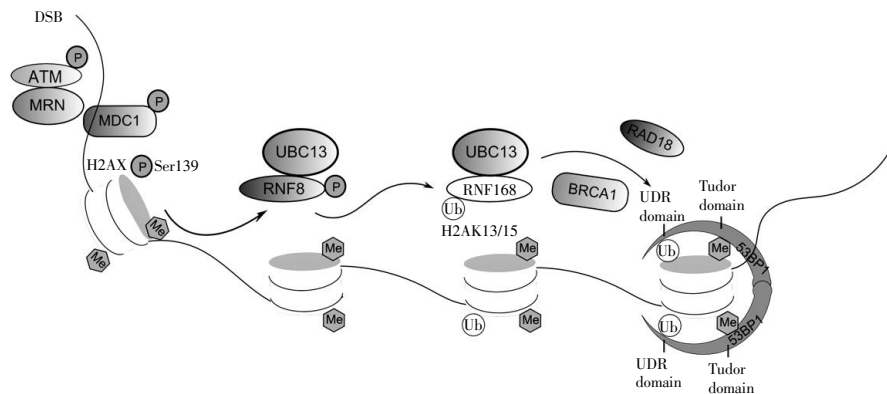
2.1 53BP1被招募到损伤染色质上

当DSBs位点被检测到后,53BP1迅速地聚集到染色质的损伤位点周围。这一过程通过一系列级联信号来驱动。首先是ATM介导的组蛋白H2A.X的磷酸化,接下来是DNA损伤检验点调节子1(mediator of DNA damage checkpoint protein 1, MDC1)被招募及依赖于RNF8-RNF168的染色质泛素化过程被激活(图1)。

在DSBs反应中,E3泛素连接酶(RNF8和RNF168)与E2结合酶(UBC13等)协同作用,将DNA损伤位点周围的染色质泛素化。RNF168的一个关键底物就是组蛋白H2A,在对DNA损伤做出响应时,H2A的Lys13和Lys15都会被泛素化(H2AK13ub/15ub)^[11]。依赖RNF8-RNF168的泛素化能在染色质上产生一个区域以容许泛素依赖的DSBs反应性蛋白(包括RNF169、BRCA1、RAD18及53BP1等)聚集于该处(图1)^[12,13]。和DSBs反应信号传导过程类似,53BP1在损伤染色质上会形成亚核位点。该位点的最小单位包括三部分:一个寡聚化基序;能结合甲基化H4K20的GAR Tudor结构域;能结合到被泛素化的H2AK15上的UDR基序。这显示招募53BP1到损伤染色质需要多种独立的蛋白协同完成^[3]。

2.2 甲基化H4K20的识别

53BP1能通过GAR Tudor结构域识别单/双甲基化的H4K20,这种识别对于将53BP1招募到

图1 染色质依赖的DSBs信号传递^[3]Fig.1 Chromatin-based DSBs signal transduction^[3]

DSBs位点至关重要。如果在53BP1的Tudor结构域里引入破坏其与H4K20me2结合的突变,会导致亚核位点不能在受损染色质周围形成^[3]。53BP1在DSBs位点结合H4K20me2的过程经过多种途径调控,包括53BP1接近组蛋白标记物和53BP1在DSBs位点处与乙酰化/泛素化通路发生交叉作用。53BP1接近甲基化染色质可以被polycomb家族蛋白L3MBTL1和去甲基化酶JMJD2A调控。这两种蛋白含有H4K20me2结合结构域,因此它们可以和53BP1竞争结合甲基化染色质。RNF8-RNF168的通路被激活后,会以泛素化依赖的方式将L3MBTL1和JMJD2A蛋白从受损染色质上清除,以增强H4K20me2与53BP1的结合^[3]。

2.3 乙酰化的识别

在受损染色质上组蛋白H3和H4的多个残基都会发生乙酰化。其中与53BP1的招募特别相关的是H4K16,其乙酰化状态直接影响53BP1的Tudor结构域与邻近的H4K20me2标记物的亲和力^[4]。DNA损伤诱导的乙酰转移酶KAT5对H4K16的乙酰化能显著减少53BP1与H4K20me2的相互作用^[5]。基于此,在DSBs区域的H4K16上发生的动态的乙酰化/去乙酰化过程能调节53BP1与染色质的相互作用,进而对DSBs修复通路的选择产生影响。

2.4 泛素化H2AK15ub的识别

53BP1稳定招募到损伤染色质位点还需要RNF168介导的H2A泛素化。研究显示RNF168介导的泛素化会改变核小体的结构以暴露出H4K20me2标记,便于被53BP1的Tudor结构域所识别^[3]。事实上,在没有DNA损伤发生的情况下,细胞内大部分的53BP1就能与甲基化的H4K20发生作用,这也提示了RNF8-RNF168介

导的染色质泛素化的功能之一是将53BP1富集到DSBs位点,并且这一过程不依赖于53BP1的Tudor结构域对H4K20me2的识别^[6]。Fradet-turcotte等^[7]的研究验证了53BP1与泛素化的H2AK15之间存在直接特异的相互作用,该作用由小UDR基序介导,这进一步支持了53BP1富集到DSBs位点的模型。

3 53BP1的有效聚集

确定各个调控途径在53BP1招募过程中的贡献对于我们建立53BP1聚集在损伤染色质上的模型极为关键。

3.1 53BP1的作用机制

53BP1在G1期参与NHEJ对DSBs的修复。在G1期,53BP1对HR的链切割有抵抗作用,这保存了DSBs的末端,使DSBs更倾向被NHEJ修复^[10]。

3.2 RIF1是关键效应子

在G1期,RIF1可以和RAP1发生相互作用。在脊椎动物细胞内,RIF1在53BP1介导的基础上,能够聚集在损伤染色质周围。因此,RIF1的缺失会破坏DSBs的代谢^[8]。蛋白质组学分析方法显示RIF1以DNA损伤依赖的方式结合到53BP1上。在老鼠的B细胞内删除RIF1基因会导致严重的CSR缺陷,其缺陷程度与在53BP1缺失的老鼠细胞内观察到的结果一致^[9]。

RIF1可以被53BP1氨基端招募到损伤染色质区域,这一结构域含有多个可以被ATM磷酸化的位点^[20]。这些位点如果发生突变(如53BP1^{28A}),会破坏53BP1与RIF1之间的作用以及RIF1在损伤染色质上的聚集。研究人员通过RIF1缺失的DT40细胞离子辐射研究,揭示了RIF1在53BP1

依赖的 DSBs 修复通路中的作用^[21]。

3.3 PTIP 作为环境特异性效应子

53BP1 的部分功能通过 PTIP 执行。PTIP 作为 MLL3-MLL4 组蛋白 H3K4 甲基转移酶复合物的一部分,可以独立调控转录过程。Callen 等^[22]的研究表明,所有 ATM 靶向的 53BP1-N 末端位点突变都会削弱 RIF1 和 PTIP 的招募,其中前 8 个位点突变会特异性地终止 PTIP 招募到损伤位点,但不影响 RIF1 聚集。这些结果提示了被 ATM 磷酸化的 53BP1 会影响 PTIP 和 RIF1 的招募,但具体作用位点存在差异。PTIP 的缺失能抑制 BRCA1 缺失细胞中 NHEJ 对 DSBs 的修复。与之一致的是 PTIP 能阻断 DSBs 的末端切割^[22]。总的来说,53BP1 和 RIF1 可能在生理性和病理性修复中都发挥作用,而 PTIP 仅对病理过程中的 DSBs 产生影响^[3]。

3.4 DSBs 切割的联合屏障

出芽酵母 Rif1-Rif2-Rap1 的结构显示,它们倾向于通过弱的多价作用寡聚成有序的手脚架结构。这种结构形成了一个分子拉链,Rap1 在 Rif1-Rif2 的骨架上再发生连接。由此推测 53BP1 与 RIF1 的协同作用也能形成类似有序的结构以稳定染色质的状态,这种状态能防御核酶及其他修饰酶的侵入,达到阻断 DSBs 切割的效果^[3]。

4 展望

53BP1 可以读取 DSBs 特异的组蛋白密码,它可以将多种对组蛋白的特异性修饰的信息翻译成有效的检验点信号并导向相应的 DSBs 修复过程。目前已经明确 53BP1 与多个因子协同参与 DSBs 修复通路的选择^[3]。在未来的研究中,我们面临的主要挑战是用生化方法重构损伤染色质,并在此基础上理解 53BP1 和它的协调作用分子怎样在 G1 阶段阻止 DSBs 切割进而执行 NHEJ 修复途径,以及这些活性在 S 期怎样被 BRCA1 抑制从而选择 HR 通路。这些结果将为未来 DSBs 修复通路选择机制的研究提供线索,也将为相关领域的临床应用提供依据。

参考文献 (References):

- JACKSON S P, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009, 461(7267): 1071-1078.
- SANDELL L L, ZAKIAN V A. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss[J]. *Cell*, 75(4): 729-739.
- PANIER S, BOULTON S J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(1): 7-18.
- IWABUCHI K, BARTEL P L, LI B, *et al.* Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994, 91(13): 6098-6102.
- LI X Y, KONG X N, WANG Y, *et al.* 53BP1 is a novel regulator of angiogenesis in breast cancer[J]. *Cancer Science*, 2013, 104(11): 1420-1426.
- HUEN M S Y, HUANG J, LEUNG J W C, *et al.* Regulation of chromatin architecture by the PWWP domain-containing DNA damage-responsive factor EXPAND1/MUM1[J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(6): 854-864.
- FERNANDEZ-CAPETILLO O, CHEN H T, CELESTE A, *et al.* DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1[J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(12): 993-997.
- WARD I M, MINN K, VAN DEURSEN J, *et al.* p53 binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(7): 2556-2563.
- LIEBER M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79(1): 181-211.
- CHAPMAN J R, TAYLOR M R G, BOULTON S J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice[J]. *Molecular Cell*, 2012, 47(4): 497-510.
- MATTIROLI F, VISSERS J H A, VAN DIJK W J, *et al.* RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling[J]. *Cell*, 2012, 150(6): 1182-1195.
- GUDJONSSON T, ALTMAYER M, SAVIC V, *et al.* TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes[J]. *Cell*, 2012, 150(4): 697-709.
- BEKKER-JENSEN S, DANIELSEN J R, FUGGER K, *et al.* HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(1): 80-86.
- HSIAO K Y, MIZZEN C A. Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2013, 5(3): 157-165.
- TANG J B, CHO N W, CUI G F, *et al.* Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(3): 317-325.
- SANTOS M A, HUEN M S Y, JANKOVIC M, *et al.* Class switching and meiotic defects in mice lacking the E3 ubiquitin ligase RNF8[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010, 207(5): 973-981.
- FRADET-TURCOTTE A, CANNY M D, ESCRIBANO-DIAZ C, *et al.* 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark[J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 50-54.
- BUONOMO S B C, WU Y, FERGUSON D, *et al.* Mammalian Rif1 contributes to replication stress survival and homology-directed repair[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 187(3): 385-398.
- CHAPMAN J R, BARRAL P, VANNIER J B, *et al.* RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(5): 858-871.
- BOTHMER A, ROBBIANI D F, DI VIRGILIO M, *et al.* Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1[J]. *Molecular Cell*, 2011, 42(3): 319-329.
- 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[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(5): 872-883.
- CALLEN E, DI VIRGILIO M, KRHLAK M J, *et al.* 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1266-1280.