

NBS1 在 DNA 断裂损伤反应和维持端粒稳定中的作用

罗浩虹 陈瑞川 李程*

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 NBS1 作为 MRE11/RAD50/NBS1 复合物的组分之一, 是细胞应答 DNA 损伤的一个关键蛋白质, 在 DNA 双链断裂修复和维持基因组稳定中发挥重要的作用。端粒是染色体末端由 DNA 重复序列和蛋白质构成的复合体, 其独特结构与 DNA 双链断裂非常相似。最近几年的研究发现 NBS1 与端粒也有着十分密切的联系。综述了 NBS1 在 DNA 损伤反应中的作用, 并探讨 NBS1 参与维持端粒稳定中的分子机制。

关键词 NBS1; 端粒; DNA 损伤

1 NBS1 基因及其表达产物

Nijmegen 断裂综合征(Nijmegen breakage syndrome, NBS)是一种少见的常染色体隐性遗传病, 其显著特征是患者具有严重的免疫缺陷, 极易患多种肿瘤疾病^[1,2]。在波兰已经登记的 48 名 NBS 患者中, 有 18 名在 15 岁就患上了淋巴瘤^[3]。NBS 患者的细胞对电离辐射非常敏感, 并表现出染色体脆性升高和细胞周期检控点调控异常等特征^[4,5]。由于 NBS 的一些症状与共济失调毛细血管扩张症突变基因(ataxia telangiectasia mutated, *ATM*)突变所致的共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, AT)非常相似, 长期以来 NBS 在临床上被看成是 AT 的一个变种。但随着研究的深入, 科学家们发现 NBS 的真正诱因是 *NBS1* 基因的突变。

NBS1 基因定位于人类染色体 8q21 上, 覆盖总长超过 48 797 bp 的基因组 DNA, 包含 16 个外显子^[6,7]。人类 *NBS1* 基因的表达产物 NBS1 由 754 氨基酸组成, 其在多种组织都有表达, 睾丸组织中的表达水平相对更高。NBS1 分为 3 个功能结构域, N 末端(aa 1~183)、中心区(aa 278~343)和 C 末端(aa 665~693)。N 末端包含有 FHA(forkhead associated domain)结构域和 BRCT(C-terminal of a breast cancer susceptibility protein)结构域, 这两种结构域在真核生物中高度保守并存在于多种核蛋白, 二者都与 DNA 损伤修复和细胞周期检控点相关, 芽殖酵母中 NBS1 的同源物 Xrs2 蛋白无 BRCT 结构域。NBS1 的 C 末端除了一段 10 aa 序列外的大多数序列与其他任何已知蛋白质都不具同源性, 但这段 10 aa 序列在所有真核生物中都是高度保守的, 酵母双杂交实验证明这段

序列能结合 MRE11 并且对于 MRE11/RAD50/NBS1 (MRN)复合物的形成是必需的。该段序列发生突变的小鼠, 在胚胎期就全部死亡, 而 C 末端其他位点突变的小鼠虽然也表现出多种类似与 NBS 患者的表型, 但仍可以存活。与此相符的是, 大多数 NBS 患者(657 位缺失突变纯合子)也是可以存活至成年期, 这就说明 NBS1 上能与 MRE11 结合的这段结构域对于维持生命是必需的^[8]。在 NBS1 的中心区含有多个可被 ATM 和 ATR(ATM-RAD3-related)磷酸化的 Ser/Glu 序列, 而当面对电离辐射时, 只有 278 和 343 位 Ser 可以被 ATM 特异性磷酸化, 这些特异性的磷酸化作用可以传递 DNA 损伤信号。两个 Ser 位点在所有的脊椎动物中都高度保守, 只是小鼠的 NBN 上 274 位的 Ser 被替换成 285 位 Thr。人类 NBS1 上含有三段核定位信号(nuclear localization signals, NLSs), 分别定位在 461~467、590~594、和 751~754 aa 上, 其中任何一段单独缺失都不会影响 NBS1 的入核(图 1)^[9]。

2 NBS1 在 DNA 双链断裂修复和细胞周期检控点调控中的作用

2.1 NBS1 在 DNA 双链断裂修复中的作用

DNA 双链断裂修复(DNA double strand break, DSB)主要涉及两条信号通路: 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组^[10]。NHEJ 主要由 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)和非同源 DNA 结合调节复合物

收稿日期: 2006-11-02 接受日期: 2007-01-29

福建省自然科学基金资助项目(No.C0210005)

* 通讯作者。Tel: 0592-2186091, E-mail: dimplelc@gmail.com

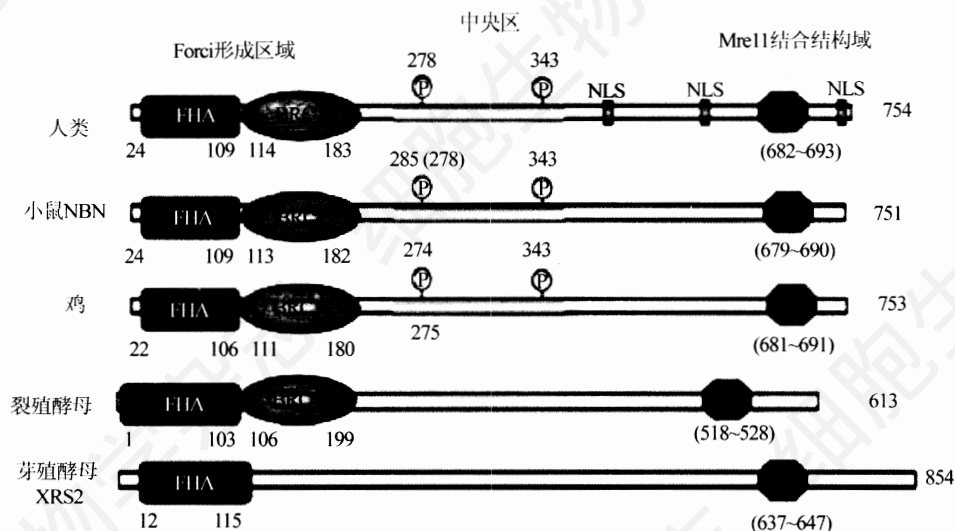


图1 几种真核生物中 NBS1 蛋白的结构^[9]

Ku(Ku70 和 Ku80 构成)来完成。Ku 异二聚体可识别并结合到游离的DSB末端,然后募集并活化DNA-PK的多个催化亚基(DNA-PK catalytic subunit, DNA-PKc)。核酸酶 Artemis 再通过与 DNA-PKcs 直接相互作用结合到 DNA 损伤位点对其进行初步的处理。最后由DNA连接酶复合物IV/XRCC4来连接DNA末端^[11]。在同源重组中DNA断裂末端首先被加工产生3'单链末端,该末端能借助RAD51插入完整染色体上的同源序列。DNA合成后Holliday结构分解,整个DNA修复完成^[12]。

电离辐射导致DSB后,ATM能结合到DSB上并通过自体磷酸化而活化,接下来ATM将H2AX磷酸化为 γ -H2AX, γ -H2AX又通过与NBS1的FHA/BRCT结构域相互作用而将MRN复合物带到DSB上^[12,13]。MRN复合物的其他两种组分MRE11和RAD50主要存在于细胞质,DSB发生后二者迅速进入细胞核形成MRN复合体,这个入核过程需要NBS1介导^[6]。MRE11具有DSB修复所需的多种生化特性,如3'~5'双链外切酶活性、单链DNA内切酶活性以及能使DNA展开的活性^[14,15]。RAD50是染色体结构稳定(structure maintenance of chromosome, SMC)蛋白家族成员之一,其N末端和C末端都具有ATP酶序列,而中部则通过柔韧性强的铰链区形成一个V结构,这种V结构不仅可充当一个桥梁来整合DSB的两个断裂末端,还能限制MRE11的核酸酶活性避免DNA过度降解(图2)^[17,18]。

NBS1通过MRN复合物在DNA修复过程中的精确作用还没有完全了解,目前比较清楚的是在动物细

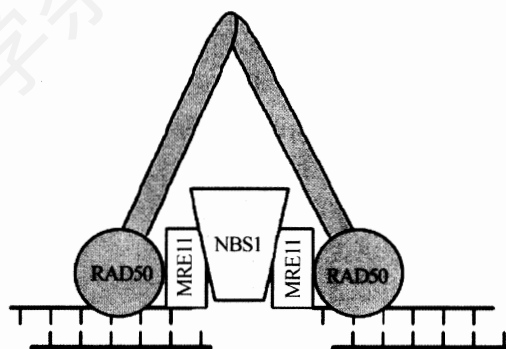


图2 MRN复合物作用示意图^[17,18]

MRN复合物是由RAD50二聚体、MRE11二聚体和一个NBS1组成。MRE11和RAD50通过NBS1的FHA/BRCT结构域与 γ -H2AX相互作用而被募集到DSB位点。RAD50二聚体通过其上的ATP酶序列结合到DSB两端,再由铰链区将断裂的两端聚合到一起。MRE11与RAD50以及DNA两端结合,通过其核酸酶的活性对DNA进行初步处理,而这种核酸酶活性受NBS1和RAD50的调节。

胞内主要通过启动同源重组来对DSB进行修复^[12]。对NBS1剔除的鸡DT40细胞系进行丝裂霉素C处理后发现,所诱导的姐妹染色单体交换(sister chromatid exchange, SCE)明显少于正常细胞系。并且DT40细胞中SCE下降的幅度与Rad54和Rad51突变细胞(二者是典型的同源重组缺陷细胞)相当^[19,20]。在DT40细胞中应用SCneo报告基因分析的方法对同源重组进行定量评估,也发现NBS1缺陷的细胞中同源重组事件的频率比野生型细胞低200倍^[21]。

由NBS1组成的MRN复合物是否在NHEJ中发挥作用以及如何发挥作用则颇具争议。在体外DNA片段连接分析中,如果体系中只添加人Ku、DNA-

PKcs 和 IV/XRCC4 连接酶复合物, 那么黏性末端的连接效率就远低于添加人细胞核抽提物的体系。如果在添加的组分中含有 MRN 复合物则 DNA 片段末端连接的活性又可恢复到添加核抽提物的水平, 这说明 MRN 复合物在 DNA 末端连接中发挥重要作用^[22]。在细胞内采用类似的分析手段发现, MRN 复合物在细胞内也能促进 DNA 片段末端连接的活性, 该过程也需要 IV/XRCC4 连接酶复合物, 不需要 DNA-PKcs^[23]。然而奇怪的是, 在 *NBS1* 剔除的鸡 DT40 细胞系中 NHEJ 事件的频率与野生型细胞无明显区别。NBS 患者细胞内 V(D)J 重组(免疫系统发育过程中, 免疫球蛋白和 T 细胞受体形成过程中的关键一步^[24])的频率和正常细胞相比也无大的差别^[25]。而在小鼠中的进一步实验又表明, 如果 V(D)J 重组发生在 TCR- β 和 TCR- γ 基因座上, 则 *NBS1* 基因的突变会明显提高染色体间的重组频率, 而对染色体内重组没有影响^[26,27]。这些证据提示, *NBS1* 可能又具有抑制染色体间的 NHEJ 的作用。

2.2 NBS1 在细胞周期检控点中的作用

真核生物的细胞周期是受严格调控的, 当细胞内的基因组 DNA 受到损伤时, 细胞周期检控点系统会暂时的停滞周期进程直至 DNA 损伤修复完毕, 因此, 在 DNA 修复和细胞周期检控点之间存在相互

联系。

NBS1 作为一个重要的 DNA 修复因子, 其在细胞周期检控点系统中也发挥关键作用(图 3)^[28]。*NBS* 细胞在接受电离辐射后表现出一系列细胞周期检控点的缺陷。最明显的是 S 期检控点缺陷导致的抗辐射 DNA 合成(radiation resistant DNA synthesis, RDS), 细胞内存在辐射引发的 DNA 损伤位点, *NBS* 细胞内的 DNA 复制仍会继续进行^[29,30]。目前已知 *NBS1* 可以影响在 S 期检控点内的三条信号通路^[31,32], 第一条就是 ATM-CHK2-CDC25A-CDK2 信号通路, 在这条通路电离辐射首先活化 ATM, 然后 ATM 再活化 CHK2, 活化的 CHK2 又能磷酸化 CDC25A, CDC25A 又可磷酸化 CDK2 导致 cyclin E/CDK2 复合物的瓦解, 而 cyclin E/CDK2 控制着细胞周期 G₁/S 的转变。已有报道通过 siRNA 来下调细胞内 *NBS1* 表达, 则电离辐射后 CHK2 活化程度下降。这提示 *NBS1* 可能通过 ATM 和 CHK2 来调控 S 期检控点^[33,34]。第二条通路是直接由 ATM、*NBS1* 和 SMC1(一种 cohesin 蛋白)组成, 在这条通路中, 活化的 ATM 对 *NBS1* 的 278 和 343 位 Ser 进行磷酸化, 磷酸化的 *NBS1* 空间构像发生变化, 能将 SMC1 传递给 ATM 发生磷酸化。SMC1 被 ATM 磷酸化后就可活化 S 期检控点。在这个过程中 *NBS1* 的磷酸化将信号传递下去^[35]。第三条通路是 ATM/

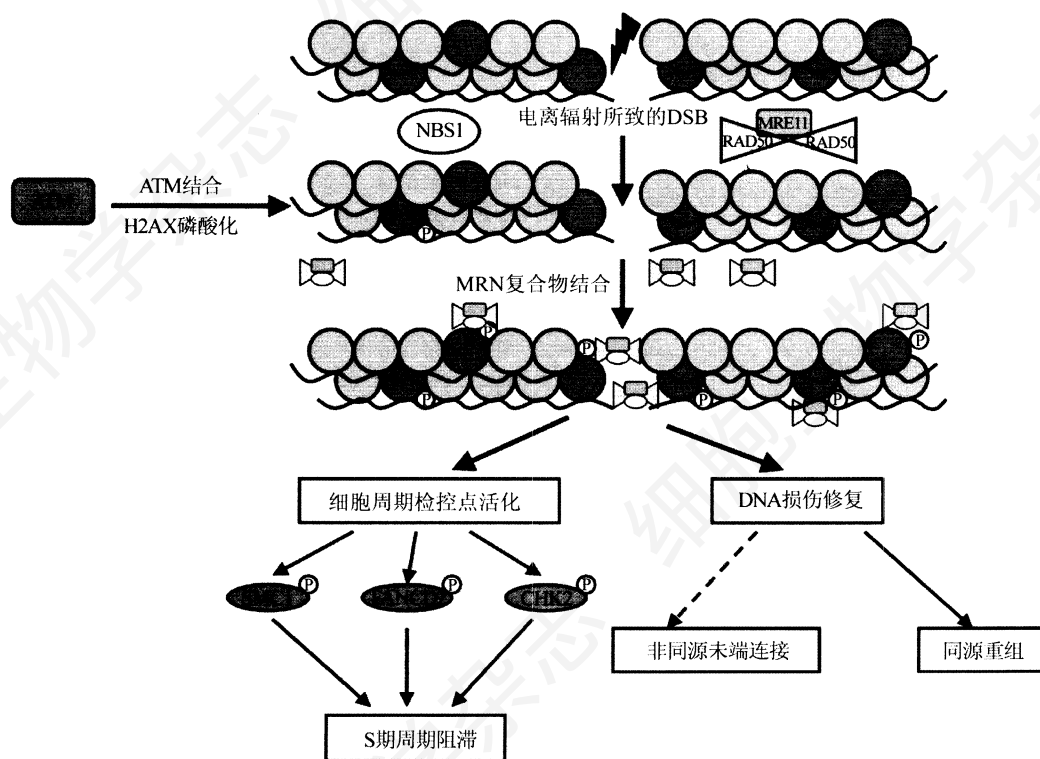


图 3 NBS1 在修复 DSB 和细胞周期检控点中的作用^[28]

FANCD2通路^[36],在这条通路中ATM磷酸化FANCD2的Ser222(FANCD2突变会导致染色体不稳定综合征Fanconi's贫血),并且该事件会激活S期检控点。这种FANCD2磷酸化需要ATM介导NBS1在Ser343的磷酸化。

也有很多研究报道NBS1也可能参与G₁、G₂期检控点调控^[37,38],但不同的研究所得到的结果并不相同,甚至相互矛盾。产生矛盾的原因可能是研究中所用细胞内NBS1突变位点并不相同。

3 NBS1与端粒

如上所述,细胞内出现的DSB会导致生长停滞和对DSB末端的修复,而染色体末端由于形成端粒帽状结构可以避免被识别为断裂的DNA。可以说,正是端粒的存在才将DNA损伤反应和对DNA修复转变为一种十分精巧的基因组完整性保护机制,那么参与DSB修复的蛋白质具有稳定端粒结构的功能就不奇怪了。人类正常细胞中具有92个端粒,理论上相当于46处DSB,但通常情况下细胞能检测到DSB的本底水平非常低,大约是0.05 DSB/细胞。之所以有如此大的差异就是新端粒形成之初端粒末端上结合有多种DNA修复蛋白,这些蛋白质虽然能连接DSB,却能抑制不恰当的端粒末端融合。目前已经证明具有这种特性的蛋白质包括DNA-PKcs、Ku70、Ku80、XRCC4和Artemis^[39,40]。

既然MRN复合物在DSB修复中发挥重要作用,那么其很可能也有保护端粒的作用^[41,42]。目前已经证明酵母中的XRS2复合物能以一种依赖于端粒酶的方式保护端粒,XRS2复合物端粒末端形成3' ssDNA,从而便于端粒酶的结合而发挥作用。在NBS患者中分离的初级成纤维细胞,其端粒缩短的速度明显快于野生型细胞。如果在NBS细胞中转染NBS1或端粒酶的催化亚基(telomerase catalytic subunit, TERT)对端粒长度变化无影响,但如果共转染NBS1和TERT就会明显的阻断端粒长度的缩短,这提示MRN复合物具有促进产生3'突出的功能,这样TERT就能以3'所在链为引物来延长端粒^[31]。从某些NBS患者中分离的T细胞系和B细胞系中端粒长度维持良好,但有些患者中的NBS1突变蛋白与上述端粒缩短患者中的不同,其上含有MRE11结合位点,提示能与MRE11结合就是NBS1保护端粒的关键所在^[43]。由于NBS是由多种NBS1基因突变产生的,这种多态性导致了NBS患者体内的不同的NBS1。端粒异常的NBS患

者可能就是由MRE11结合位点突变造成的。

许多肿瘤起源细胞和体外培养的永生细胞系,并不表达可测知的端粒酶活性,而是通过一种被称作替代性端粒延长(alternative lengthening of telomeres, ALT)的机制来维持端粒长度。在这种ALT细胞中经常观察到端粒与一种核内早幼粒细胞白血病小体(promyelocytic leukemia body, PML小体)相结合。PML小体一般都是在细胞永生过程中伴随着ALT机制活化而一起出现的,其中含有多种与同源重组相关的蛋白质,例如RPA、RAD51和RAD52。NBS1的BRCT结构域能与一种PML小体结合蛋白——SP100相互作用从而结合到PML小体上,进而NBS1又将RAD50、MRE11和BRCA1募集到PML小体上来^[44]。在ALT细胞中,NBS1在G₁~G₂期与PML小体结合,但是PML小体与端粒共定位只发生在G₂期,这提示PML小体是在其发挥维持端粒稳定的过程中形成的。减数分裂过程中MRE11-NBS1-PML小体也能共定位在端粒上^[45],表明NBS1在正常细胞中也可能发挥稳定端粒的功能。

4 展望

作为DNA断裂损伤修复和端粒长度调控的重要因子,NBS1在整个信号转导过程中发挥重要作用。其功能缺失不仅会导致细胞内发生DNA损伤时难以进行及时的修复,也会使端粒难以维持正常的稳定结构,大大提高细胞癌变的机率。虽然对NBS1的功能已经有了相当多的研究,但对于诸如NBS1上的磷酸化位点,在磷酸化后如何去磷酸化投入下一次循环;NBS1上的多个NLSs对其发挥作用的作用;除TRF2(TTAGGG repeat binding factor 2)外,其他端粒结合蛋白是否也能与NBS1相互作用等问题都还有待于更深入的了解。这些问题的研究不仅会使人们对NBS1有更加全面的认识,也会为最终揭示细胞衰老和癌变的分子机制提供帮助。

参考文献 (References)

- [1] Taylor AM. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001, **14**: 631
- [2] Wilda M et al. *Hum Mol Genet*, 2000, **9**: 1739
- [3] Seidemann K et al. *Med Pediatr Oncol*, 1999, **33**: 536
- [4] Tauchi H et al. *Nature*, 2002, **420**: 93
- [5] Buscemi G et al. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**: 5214
- [6] Tauchi H et al. *Oncogene*, 2002, **21**: 8967
- [7] Distel L et al. *Med Pediatr Oncol*, 2003, **41**: 44
- [8] Maser RS et al. *Nat Genet*, 2001, **27**: 417
- [9] Iijima K et al. *Chromosoma*, 2004, **113**: 53

- [10] Ferguson DO *et al. Oncogene*, 2001, **20**: 5572
- [11] Collis SJ *et al. Oncogene*, 2005, **24**: 949
- [12] Matsuura S *et al. Adv Biophys*, 2004, **38**: 65
- [13] Kobayashi J *et al. Curr Biol*, 2002, **12**: 1846
- [14] Paull TT *et al. Mol Cell*, 1998, **1**: 969
- [15] Paull TT *et al. Genes Dev*, 1999, **13**: 1276
- [16] D'Amours D *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 317
- [17] Chen L *et al. Mol Cell*, 2001, **8**: 1105
- [18] Zhang Y *et al. Cell Res*, 2006, **16**: 45
- [19] Sonoda E *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 5166
- [20] Takata M *et al. Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 6476
- [21] Haber JE. *Cell*, 1998, **95**: 583
- [22] Huang J *et al. Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: 667
- [23] Udayakumar D *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 41631
- [24] Clatworthy AE *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 20247
- [25] Harfst E *et al. Mol Immunol*, 2000, **37**: 915
- [26] Kang J *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 1447
- [27] Williams BR *et al. Curr Biol*, 2002, **12**: 648
- [28] Kobayashi J *et al. DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**: 855
- [29] Shiloh Y. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**: 155
- [30] Shiloh Y. *Cell Cycle*, 2003, **2**: 116
- [31] Weizman N *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 6741
- [32] Bakkenist CJ *et al. Cell*, 2004, **118**: 9
- [33] Falck J *et al. Nature*, 2005, **434**: 605
- [34] Lee JH *et al. Science*, 2004, **304**: 93
- [35] Tauchi H *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 12
- [36] Lavin MF *et al. Mutat Res*, 2005, **569**: 123
- [37] Zhao S *et al. Nature*, 2000, **405**: 473
- [38] Unsal-Kacmaz K *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 1292
- [39] Rothkamm K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 5057
- [40] Gilley D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 15084
- [41] Espejel S *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 2207
- [42] Rooney S *et al. Mol Cell*, 2002, **10**: 1379
- [43] Ranganathan V *et al. Curr Biol*, 2001, **11**: 962
- [44] de Lange T. *Oncogene*, 2002, **21**: 532
- [45] de Lange T. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**: 323

The Role of NBS1 in DNA Double Strand Break Damage Response and Telomere Stability

Hao-Hong Luo, Rui-Chuan Chen, Cheng Li*

(The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The NBS1 is a component of the MRE11/RAD50/NBS1 complex (MRN) and plays a critical role in the DNA double strand break (DSB) repair and the maintenance of chromosomal integrity. The telomere is a unique chromosomal structure consisting of repetitive DNA sequences bound by protein complexes, which is similar with DSB. The mechanisms of NBS1 in DNA damage response and maintenance of telomere stability are reviewed in this paper.

Key words NBS1; telomere; DNA damage

Received: November 2, 2006 Accepted: January 29, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.C0210005)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2186091, E-mail: dimplelc@gmail.com

*