

# DNA 拓扑异构酶 II $\beta$ 结合蛋白 1(TopBP1) 磷酸化功能位点推测及功能分析

王 鑫<sup>1,2,3</sup>, 张伶俐<sup>1,2,3</sup>, 林芸竹<sup>1,2,3</sup>, 刘砚韬<sup>1,2,3</sup>

(1. 四川大学华西第二医院药学部, 成都 610041; 2. 四川大学华西第二医院循证药学中心, 成都 610041;  
3. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 成都 610041)

**摘 要:** 为阐明 DNA 拓扑异构酶 II  $\beta$  结合蛋白 1(TopBP1)参与 DNA 损伤修复应答的分子机制,本研究通过生物信息学分析,发现多个潜在的 TopBP1 磷酸化位点 T860, S887, T1104 及 T1167,利用分子生物学手段从人 cDNA 文库中扩增并获得 TopBP1 克隆质粒,将上述磷酸化位点突变为丙氨酸,观察突变质粒转染细胞对 DNA 损伤修复的应答反应. 结果显示,在粒子射线照射或化疗药物处理细胞后,第 1104 丙氨酸突变(T1104A)的 TopBP1 蛋白导致 pR-PA32-S33 的磷酸化水平大幅降低,同时细胞周期检验点失活,严重阻滞了 DNA 应激反应,证实 T1104 是 TopBP1 参与 DNA 损伤修复的关键活性位点.

**关键词:** DNA 拓扑异构酶 II  $\beta$  结合蛋白 1(TopBP1); 脱氧核糖核酸(DNA); DNA 损伤应答  
**中图分类号:** Q71      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.056001

## Prediction and functional analysis of DNA topoisomerase II $\beta$ -binding protein 1(TopBP1) phosphorylation sites

WANG Xin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Ling-Li<sup>1,2,3</sup>, LIN Yun-Zhu<sup>1,2,3</sup>, LIU Yan-Tao<sup>1,2,3</sup>

(1. Department of Pharmacy, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;  
2. Evidence-Based Pharmacy Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;  
3. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University),  
Ministry of Education, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** To elucidate the molecular mechanism of DNA topoisomerase II binding protein 1 (TopBP1) involved in DNA damage repair response, this study found several potential phosphorylation sites (T860, S887, T1104 and T1167) of TopBP1 through bioinformatics analysis. The TopBP1 was amplified from the human cDNA library and cloned into plasmid via molecular biology, and the above phosphorylation site was mutant to alanine to observe the response of the cells transfected with the mutant plasmid to DNA damage repair. Results showed that TopBP1 protein with the 1104th alanine mutation (T1104A) significantly reduced the phosphorylation level of pRPA32-S33 and inactivated the cell cycle checkpoint after the irradiation or chemotherapy drug treatment, which severely blocked DNA stress response. This study confirms that T1104 is the key activity site of TopBP1 involved in DNA damage repair.

**Keywords:** DNA topoisomerase II  $\beta$ -binding protein 1(TopBP1); Deoxyribo nucleic acid(DNA); DNA damage response

收稿日期: 2021-11-13  
基金项目: 四川省科技厅科技计划项目(2020YFH0019)  
作者简介: 王鑫(1992-), 男, 四川仁寿人, 药师, 研究方向为肿瘤的发病机制. E-mail: 378412035@qq.com  
通讯作者: 刘砚韬. E-mail: terryandy\_2001@163.com

## 1 引言

DNA 损伤修复信号网络在真核细胞中高度保守,当 DNA 受到内源性或外源性破坏时,细胞周期检验点迅速激活并阻滞细胞周期以完成损伤修复.该过程依赖于两个重要的激酶:ATM 蛋白(Ataxia telangiectasia mutated, ATM)、ATM 与 Rad3 相关蛋白(ATM and Rad3 related, ATR)<sup>[1-3]</sup>.其中,ATM 是 DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)的早期激活因子,它能迅速磷酸化 H2AX 羧基端 139 位丝氨酸形成  $\gamma$ H2AX,同时募集大量下游修复因子如 Nbs1、53BP1、MDC1 等参与 DNA 损伤修复<sup>[4]</sup>;而 ATR 主要是在 DNA 复制检验点被激活,参与单链 DNA 的合成与修复,保证 DNA 复制的正常进行<sup>[5, 6]</sup>.

DNA 拓扑异构酶 II  $\beta$  结合蛋白 1 (Topoisomerase II  $\beta$ -binding protein 1, TopBP1)是一个重要的骨架蛋白,它含有 9 个 BRCT 结构域以及多个可磷酸化位点<sup>[7]</sup>.BRCT 结构域在 DNA 损伤应答中具有重要作用,它能够调节蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 之间的相互作用.因此,TopBP1 在核酸代谢中发挥着至关重要的作用.研究表明,TopBP1 受 Cdk2 和 Akt 的调控,并参与细胞周期的转换<sup>[8]</sup>;同时,TopBP1 第 7~8 个 BRCT 结构域可域磷酸化的 PHF8 相互作用,参与 DNA 复制检验点的调控<sup>[9]</sup>;重要的是,Leimbacher 等指出,TopBP1 与 MDC1 相互作用,并维持有丝分裂过程中染色体结构的稳定<sup>[10]</sup>.由此可见,TopBP1 几乎参与了细胞增殖过程中的所有生命活动,是 DNA 代谢过程中不可或缺的重要蛋白.

为探寻 TopBP1 更多的生物学功能,本研究通过生物学分析发现多个潜在的 TopBP1 磷酸化基序,并在进化过程中保守,分别是 T860, S887, T1104 及 T1167.利用分子生物学手段,我们从人 cDNA 文库中扩增并获得 TopBP1 克隆质粒,同时对上述磷酸化位点突变(突变为丙氨酸),将突变质粒转染细胞后观察细胞对 DNA 损伤修复的应答反应.在粒子射线照射后,过表达第 1104 丙氨酸突变(T1104A)TopBP1 蛋白的细胞中 RPA32-S33 的磷酸化水平明显降低,细胞对 DNA 双链断裂的应激反应明显失活,提示了第 1104 苏氨酸可能是 TopBP1 的一个重要的功能位点.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

大肠杆菌菌种 DH5 $\alpha$  及克隆载体 pEGFP-C3-TopBP1 由四川大学华西第二医院基因组稳定性实验室提供,限制性内切酶及转染试剂 lipo 2000 购自于 Roche,DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自于 Invitrogen 公司,RPA32-S33 抗体及荧光二抗购自于 Millipore 公司,引物合成及测序由上海生工完成.

### 2.2 方法

2.2.1 TopBP1 突变质粒的构建及鉴定 通过生物信息学分析出 TopBP1 可能的功能位点 T860, S887, T1104 及 T1167,设计其对应位点的上下游引物:

T860G-For: GGAAACCGAGTGGCCCACT CTCAGAAGTTATTG

T860G-Rev: CAATAACTTCTGAGAGTGG GCCACTCGGTTTCC

S887G-For: TGTCGCTCTTTCTGCCGGCC CTCAACTGAAAGAG

S887G-Rev: CTCTTTCAGTTGAGGGCCG GCAGAAAGAGCGACAG

T1104G-For: TAACAGCGCATCTTCAGGC CCTGACAGCACTCG

T1104G-Rev: CGAGTGCTGTCAGGGCCTG AAGATGCGCTGTTAC

T1167G-For: CTAGTTGTCCCGACAATA CTCTGAGCTTC

T1167G-Rev: GAAGCTCAGAGTATTGTC CGGGACAACCTAG

TopBP1 的 siRNA 抗性质粒上下游引物为:

For: GATGTGAAGGATGCACTTGCTGC-CTTGAAACTCCAGGA

Rev: TCCTGGAGTTTCCAAGGCAGCAAG TGCATCCTTCACATC

利用 Q5 高保真 DNA 聚合酶(NEB, M0491S)扩增出含有突变 TopBP1 的质粒,纯化回收后利用 Dpn I (NEB, R0176S)将原始模板酶切消化后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂布于卡那霉素培养皿 37  $^{\circ}$ C 培养过夜,筛选阳性克隆后测序鉴定.

2.2.2 核酸转染细胞 将 293T 细胞均匀地铺在 6 孔板中,每孔约 20 万细胞,第二天转染前 1 h 换液.在 1 mL opti-MEM 中加入 5  $\mu$ g 目的质粒或

siRNA(终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , siTopBP1: 5'-AAC-GAAGACUAGCACUUGCAG-3'),振荡混匀后加入 5  $\mu\text{L}$  lipo2000 转染液(Thermo, 12566014),室温静置 20 min 后缓慢地加入细胞培养基中,轻微振荡,将细胞静置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养,48 h 后可检测转染效果.

2.2.3 RPA32-S33 免疫荧光染色 将 293T 细胞均匀铺在含有 8 mm $\times$  8 mm 扒片的 24 孔板中,每孔约 5 万细胞.第 2 d,对细胞进行粒子射线照射.照射后于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 2 h、4 h 收样.吸去培养基并用 PBS 洗 2 次,加入 4% PFA 固定 10 min. PBS 洗 1 次,加入封闭液封闭 1 h 后加入 RPA32-S33 抗体(Novus, NB100-544;1 : 500 稀释于封闭液中)于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h. PBS 洗 1 次后加入 CY3 荧光基团标记的兔抗人二抗(1 : 200 稀释于封闭液中)于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h. PBS 洗 1 次后封片并于荧光显微镜(奥林巴斯, BX51)下观察.

2.2.4 免疫印迹 将 293T 细胞均匀铺在 24 孔板中,转染相应的 TopBP1 突变体. 48 h 后,用 2  $\mu\text{mol/L}$  CPT 处理细胞 2 h 后收集细胞. SDS 上样缓冲液裂解后细胞后进行 8% 聚丙烯酰胺垂直电泳,并将蛋白转印至 PVDF 膜上. 通过 pChk1-S345 (CST, 2341)、gama-H2Ax (CST-9718S) 或 Tubulin(sigma, T6074) 抗体检测对应的蛋白质,利用 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像.

3 结 果

3.1 TopBP1 突变质粒的构建与鉴定

通过 NCBI 查找 TopBP1 的蛋白质序列,其 NCBI 号为 NP\_008958. 2. 利用 DNAMAN 对生物进化中不同物种的 TopBP1 蛋白序列进行保守性分析,并比对可能的磷酸化功能位点,如 TQ/SQ/TP/SP 基序,最后推测出 4 个功能目前未知的磷酸化功能位点:T860, S887, T1104 及 T1167(见图 1). 这些位点在进化中相当保守,利用设计的引入突变位点的特异性引物,以已有的 pEGFP-C3-TopBP1 质粒作为模板,PCR 扩增出相对应的含有 TopBP1 突变等位基因的质粒全长(见图 2). 在 DpnI 的消化下,原始模板质粒被降解. 转化至卡那霉素平板上培养 1 d 后,挑取单克隆,提取质粒并测序,测序结果证实 pEGFP-C3-TopBP1 突变质粒克隆成功.

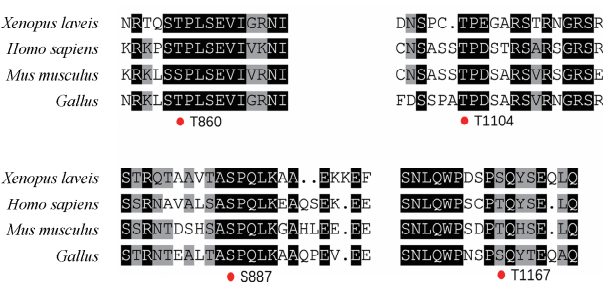


图 1 TopBP1 氨基酸序列的保守型分析  
Fig. 1 Conserved analysis of TopBP1 amino acid sequence

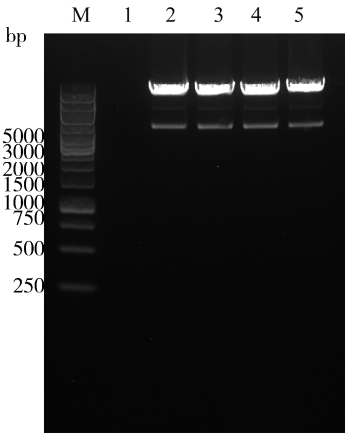


图 2 TopBP1 突变特异性引物 PCR 结果电泳图  
M: DNA marker(thermo, SM0311); 1:阴性对照(无 DNA 模板); 2:T860A; 3:S887A; 4:T1104A; 5:T1167A  
Fig. 2 Electrophoretic diagram of PCR results of TopBP1 mutation-specific primers  
M:DNA marker(thermo, SM0311); 1:Negative control (no DNA template); 2:T860A; 3:S887A; 4:T1104A; 5:T1167A

3.2 TopBP1 突变质粒的转染及表达

获得 pEGFP-C3-TopBP1 突变质粒后,利用 lipo 2000 转染至 293T 细胞,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 48 h 后直接在正置荧光显微镜下观察,细胞激发出绿色荧光,说明融合蛋白 EGFP-TopBP1 表达成功(见图 3,仅展示 T1104A 突变荧光成像图).

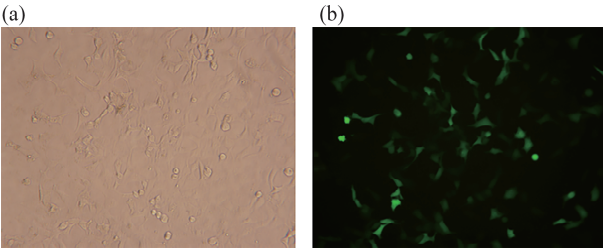


图 3 TopBP1 突变质粒转染细胞的绿色荧光成像  
(a)白光通道; (b)蓝光通道  
Fig. 3 Green fluorescence imaging of cells transfected with TopBP1 mutant plasmid  
(a) White light channel; (b) blue channel

### 3.3 TopBP1 突变质粒转染细胞后对粒子射线的应激反应

对过表达 TopBP1 质粒的细胞进行 2 Gy 的粒子射线照射后,正常细胞在 1 h 内就产生大量 RPA32-S33 的荧光灶点以完成 DNA 修复和细胞周期检验点的激活,但在转染突变质粒的细胞中出现了部分缺陷,特别是第 1104 位苏氨酸突变(T1104A),表明其在 RPA32 的磷酸化活化过程中具有重要作用.而在照射后较长时间(12 h)后,正常细胞的 RPA32-S33 荧光灶点基本消失,预示着 DNA 修复的完成,但在 T1104A 细胞中,RPA32-S33 的荧光灶点呈现缓慢上升的趋势,提示 T1104 的突变干扰了 DNA 修复过程,T1104 可能是 TopBP1 的一个关键功能域(图 4).

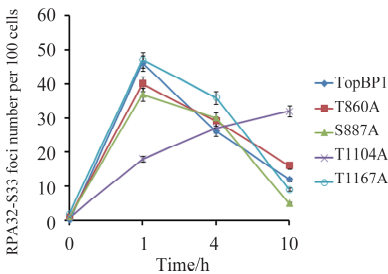


图 4 粒子射线照射后 RPA32-S33 统计图  
Fig. 4 Focal point statistics of RPA32-S33 after particle ray irradiation

### 3.4 TopBP1 突变质粒感染细胞周期检验点的激活

TopBP1-ATR 通路是细胞周期检验点激活的关键机制,对 S 期 DNA 复制压力的释放和 G2/M 期损伤修复至关重要.为了解 TopBP1 突变体对细胞周期检验点激活的影响,使用基因毒物 CPT 处理细胞后通过免疫印迹检测细胞周期检验点的效应分子 pChk1-S345 的激活情况(见图 5),结果表明 TopBP1-T1104A 突变体导致了细胞周期检验点的失活.重要的是,DNA 损伤的感应分子 gamma-H2Ax 的激活同样被 TopBP1-T1104A 突变体阻断.因此,当 TopBP1 蛋白的 T1104 位点突变时,由于 DNA 修复的启动异常和细胞周期检验点的失活,带有染色质突变的细胞继续分裂并造成突变的积累,导致基因组的不稳定,最终可能引发肿瘤.

为进一步排除内源性 TopBP1 蛋白对突变蛋白功能的影响,我们构建了 T1104A 突变的 siRNA 抗性质粒.在利用 siTopBP1 沉默内源性 TopBP1 蛋白的情况下,细胞周期检验点效应蛋白

Chk1 的磷酸化明显失活,该缺陷能被过表达野生型 TopBP1 载体所拯救,但过表达 T1104A 突变载体的细胞仍然出现了细胞周期检验点的失活,证实了 TopBP1 的 1104 位苏氨酸对其功能发挥的关键作用(见图 6).

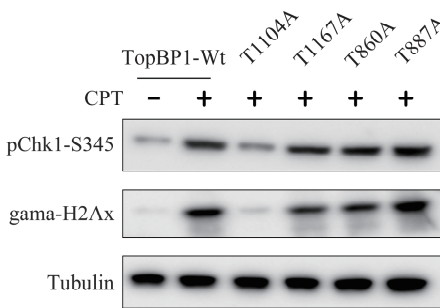


图 5 CPT 处理细胞后的免疫印迹成像  
Fig. 5 Western detection of cells with CPT treatment

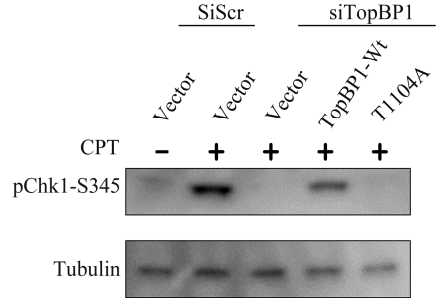


图 6 CPT 处理细胞后的免疫印迹成像  
Fig. 6 Western detection of cells with CPT treatment

## 4 讨论

TopBP1 是 ATR 通路中一个关键的信号传递分子,在早期的研究中发现 TopBP1 的活化是 ATR 通路信号转导所必需的.依赖于位于第 6、7 个 BRCT 结构域之间的 AAD 结构域(ATR-activating domain),TopBP1 能直接激活 ATR,保证 ATR 对下游信号传递分子的激酶活性<sup>[11, 12]</sup>.同时,TopBP1 的氨基端能与 9-1-1 复合物(Rad9-Hus1-Rad1)直接结合,由 Rad17 介导募集质 DNA 复制及同源重组修复位点,参与 DNA 复制和同源重组修复<sup>[13, 14]</sup>.由此可见,TopBP1 的功能复杂多样,其参与了细胞的多个生命活动如 DNA 复制与修复、基因的表达、周期检验点的激活等<sup>[15]</sup>.但 TopBP1 在这些生理活动中发挥了怎样的关键作用,其具体分子机制及过程尚不明确.

本研究通过生物信息学分析,发现 T860, S887, T1104 及 T1167 等 4 个在进化上保守的磷酸化基序可能是 TopBP1 重要的功能位点,并通过



分子生物学手段对这些位点进行了突变,在 293T 细胞中过表达 TopBP1 突变蛋白,发现第 1104 位苏氨酸的突变严重阻滞了 DNA 损伤通路的激活及修复过程,提示 T1104 是 TopBP1 重要的功能位点,为 TopBP1 参与 DNA 修复的具体分子机制提供了重要线索和方向.然而,第 1104 位苏氨酸具体参与 DNA 修复的过程及其相互作用的具体蛋白质尚不清楚,尚待进一步的研究进行证实.

参考文献:

[1] Foo T K,Vincelli G, Huselid E, *et al.* ATR/ATM-mediated phosphorylation of BRCA1 T1394 promotes homologous recombinational repair and G(2)-M checkpoint maintenance [J]. Cancer Res, 2021, 81: 4676.

[2] Tannous E A, Burgers P M. Novel insights into the mechanism of cell cycle kinases Mec1 (ATR) and Tel1 (ATM) [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2021, 56: 441.

[3] Williams R M, Zhang X. Roles of ATM and ATR in DNA double strand breaks and replication stress [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2021, 161: 27.

[4] Gupta R, Somyajit K, Narita T, *et al.* DNA repair network analysis reveals shieldin as a key regulator of NHEJ and PARP inhibitor sensitivity [J]. Cell, 2018, 173: 972.

[5] Ma M, Rodriguez A, Sugimoto K. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition [J]. Curr Genet, 2020, 66: 327.

[6] Frattini C, Promonet A, Alghoul E, *et al.* TopBP1 assembles nuclear condensates to switch on ATR signaling [J]. Mol Cell, 2021, 81: 1231.

[7] Montales K, Kim A, Ruis K, *et al.* Structure-func-

tion analysis of TopBP1's role in ATR signaling using the DSB-mediated ATR activation in *Xenopus* egg extracts (DMAX) system [J]. Sci Rep, 2021, 11: 467.

[8] Liu K, Graves J D, Lee Y J, *et al.* Cell cycle-dependent switch of TopBP1 functions by Cdk2 and Akt [J]. Mol Cell Biol, 2020, 40: e00599.

[9] Ma S, Cao C, Che S, *et al.* PHF8-promoted TOPBP1 demethylation drives ATR activation and preserves genome stability [J]. Sci Adv, 2021, 7: eabf7684.

[10] Leimbacher P A, Jones S E, Shorrocks A K, *et al.* MDC1 interacts with TopBP1 to maintain chromosomal stability during mitosis [J]. Mol Cell, 2019, 74: 571.

[11] Zhou Z W, Liu C, Li T L, *et al.* An essential function for the ATR-activation-domain (AAD) of TopBP1 in mouse development and cellular senescence [J]. PLoS Genet, 2013, 9: e1003702.

[12] Thada V, Cortez D. Common motifs in ETAA1 and TopBP1 required for ATR kinase activation [J]. J Biol Chem, 2019, 294: 8395.

[13] Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, *et al.* Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage [J]. DNA Repair (Amst), 2014, 21: 1.

[14] Kim A, Montales K, Ruis K, *et al.* Biochemical analysis of TopBP1 oligomerization [J]. DNA Repair (Amst), 2020, 96: 102973.

[15] Bagge J, Oestergaard V H, Lisby M. Functions of TopBP1 in preserving genome integrity during mitosis [J]. Semin Cell Dev Biol, 2021, 113: 57.

引用本文格式:

中文: 王鑫, 张伶俐, 林芸竹, 等. DNA 拓扑异构酶 II  $\beta$  结合蛋白 1(TopBP1)磷酸化功能位点推测及功能分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 056001.

英文: Wang X, Zhang L L, Lin Y Z, *et al.* Prediction and functional analysis of DNA topoisomerase II  $\beta$ -binding protein 1(TopBP1) phosphorylation sites [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 056001.