

TopBP1 在 DNA 损伤修复及乳腺癌发生中的作用

汪海新 应明真 王 梅

一、概 述

人类 DNA 拓扑异构酶 II β 结合蛋白 1 (DNA topoisomerase II β - binding protein 1, TopBP1) 是最初于 1997 年由 Yamane 等人经双杂交筛选分离得到的一种能结合到 DNA 拓扑异构酶 II β 蛋白 C 末端区域的蛋白^[1]。TopBP1 基因定位于人类染色体 3q22.1, 含 29 个外显子, 编码的 TopBP1 蛋白含 1522 个氨基酸, 分子质量 180kDa。人类 TopBP1 蛋白的同系物包括爪蟾的 Xcut5/Xmus101, 果蝇的 Mus101, 线虫的 MUS-101, 拟南芥的 Mei1, 啤酒酵母的 Dpb11, 裂殖酵母的 Cut5/Rad4 等^[2]。

TopBP1 与乳腺癌易感基因 1 蛋白 (breast cancer susceptibility gene 1, Brca1) 存在结构上的同源性, 表现在 TopBP1 蛋白包含 8 个 Brca1 羧基末端 (brca1 carboxy terminus, BRCT) 功能域。BRCT 功能域能够和其他的 BRCT 功能域、非 BRCT 功能域, 以及 DNA 链断裂区域结合, 在 DNA 损伤修复和细胞周期调控中发挥作用^[3]。低等真核生物和酵母的 TopBP1 同系物较脊椎动物的 TopBP1 蛋白要小很多, 比如果蝇、线虫和酵母的 TopBP1 同系物就分别有 7 个、6 个和 4 个 BRCT 功能域, 表明这些功能域在生物体进化过程中逐渐产生并增加了不同的功能^[4]。TopBP1 能与多种蛋白相互作用且有特定的结合区域, 例如 TopBP1 与多聚 ADP 核糖聚合酶 1 [poly (ADP - ribose) polymerase - 1, PARP - 1] 的自动 ADP 核糖基化位点有序列同源性, 这两种蛋白的相互作用依赖于 TopBP1 的第 6 BRCT 功能域^[5]。

DNA 双链断裂 (DNA double - strand break, DSB) 是最严重的 DNA 损伤, 哺乳动物细胞 DNA 修复基因或蛋白表达异常造成修复能力下降或缺乏可导致基因组不稳定以及肿瘤的发生^[6]。TopBP1 是一种重要

的蛋白, 在维持基因组稳定性方面有多种功能, 本文就 TopBP1 蛋白在 DNA 损伤修复及乳腺癌发生中的作用做一综述。

二、TopBP1 参与 DNA 损伤反应

真核细胞基因组经常面临因暴露于外源性或内源性 DNA 损伤因子而导致的基因突变压力, 在 S 期更易出现 DNA 断裂, 若不能修复或不正确修复, 对细胞活性和基因组稳定性将产生严重威胁。DNA 双链断裂主要通过同源重组 (homologous recombination, HR) 及非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ) 途径修复。围绕这些修复通路, 哺乳动物产生 DNA 损伤反应 (DNA damage response, DDR), 其作用是察觉 DNA 损伤和激活信号传导级联, 用以启动损伤修复及阻滞细胞周期直至修复完成^[7]。TopBP1 具有与多种 DNA 损伤反应蛋白相互作用的能力, 参与 DNA 损伤反应过程。

真核细胞 DNA 双链断裂后通过信号转导通路而激活 DNA 修复过程及细胞周期检查点。在高等真核细胞, 染色质 DNA 双链断裂迅速启动组蛋白变体 H2AX 在 139 位丝氨酸位点磷酸化, 形成 γ H2AX, 并以此作为 DNA 损伤引发信号级联反应核心组分的聚集场所, 因而 γ H2AX 的形成被认为是 DNA 双链断裂损伤的标志。 γ H2AX 的磷酸化过程需要磷酸肌醇 3 - 激酶相关激酶 (phosphoinositide 3 - kinase related kinases, PIKK) 家族成员毛细血管扩张症突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated, ATM)、ATM 与 Rad3 相关蛋白 (ATM and Rad3 related, ATR) 和 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚单位 (DNA dependent protein kinase catalytic subunit, DNA - PKcs) 的激活, 其中以 ATM 为主^[8]。 γ H2AX 形成后随即招募其他 DNA 损伤反应蛋白, 包括 Nijmegen 断裂综合征蛋白 1 (Nijmegen breakage syndrome 1, Nbs1)、P53 结合蛋白 1 (P53 binding protein 1, 53BP1)、DNA 损伤检查点蛋白调节子 1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1, MDC1) 和 TopBP1 等。在 DNA 损伤反应中 Mre11 - Rad50 - Nbs1 (MRN) 复合体有助于 TopBP1 与 ATM

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072175; 81102010); 上海市科委资助项目 (06DZ19505; 114119a7500); 上海市卫生局科研项目 (2009113; 2011198); 上海市重点学科建设项目 (B905)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者: 王梅, 副主任医师, 副教授, 电子邮箱: wangmeib0211@hotmail.com

相联系,而 TopBP1 的第 1、2BRCT 功能域能与 MRN 复合体中 Nbs1 亚单位相互作用,维持 DNA 双链断裂后正常的检查点功能^[9]。免疫共沉淀 TopBP1 和 53BP1 提示这两个蛋白能够物理接触且相互作用。在 DNA 双链断裂时,TopBP1 和 53BP1 共定位于 DNA 损伤位点,TopBP1 的第 4、5 BRCT 功能域与 53BP1 相互作用,在 G₁ 期介导 53BP1 的检查点功能^[10]。MDC1 是细胞应对 DNA 双链断裂的重要检查点蛋白,Wang 等^[11]研究发现 TopBP1 与 MDC1 在控制 DNA 复制检查点方面有功能相关性。特异性 TopBP1 - MDC1 相互作用是由 TopBP1 的第 5BRCT 功能域与 MDC1 的丝氨酸 - 天冬氨酸 - 苏氨酸残基重复序列介导,从而 DNA 双链断裂信号经 H2AX/MDC1 级联转导放大后,使 TopBP1 聚集于阻滞的复制叉。TopBP1 与这些蛋白之间的生物学行为上调和稳定了 TopBP1 和 γ H2AX 的共定位效应,从而也证明 TopBP1 参与 DNA 损伤反应过程。

作为多功能肿瘤抑制因子的早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 在 DNA 双链断裂同源重组修复中对 Rad51、Mre11、Brcal 蛋白的聚集和定位都有作用,而 PML 过表达有稳定 TopBP1 的作用^[12]。Morishima 等^[13]在用 siRNA 沉默 TopBP1 后,发现细胞对丝裂霉素 C 和电离辐射敏感性增加,自发性或丝裂霉素 C 诱导性的姐妹染色单体互换水平下降,且经 TopBP1 siRNA 转染的细胞同源重组修复较正常对照细胞下降 2 倍。从而说明 TopBP1 在 DNA 双链断裂同源重组修复中发挥重要作用。

三、TopBP1 是 ATR - Chk1 通路的介导蛋白

在 DNA 损伤反应的顶点发挥调节作用的蛋白激酶 ATM、ATR 和 DNA - PKcs 都属于 PIKK 激酶家族,能够探测到损伤的 DNA、阻滞的复制叉或 DNA 修复的中间体。DNA 双链断裂激活 ATM 和 DNA - PKcs,而 DNA 双链断裂、复制应激、碱基加合物及 DNA 链交联均可激活 ATR^[14]。ATR 被激活后可使下游众多底物磷酸化,其中最重要的是检查点激酶蛋白 1 (checkpoint kinase protein 1, Chk1) 的磷酸化,使得 DNA 损伤信号进一步转导到 p53、Cdc25A、Cdc25C 等,从而在 DNA 损伤后复制起始、复制叉稳定性、细胞周期检查点和 DNA 修复方面发挥重要的生物学效应^[15]。ATR 是细胞生存所必需的,功能上相当于 DNA 损伤反应的主调节器,因而 ATR - Chk1 通路是 DNA 损伤反应中的重要通路。

ATR 能被多种 DNA 损害所激活,而通用的刺激信号是在 DNA 损伤和复制应激过程中产生的单链 DNA (single - strand DNA, ssDNA)。由于伸展的 ssDNA 对细胞是有害的,因而迅速被复制蛋白 A (replication protein A, RPA) 包裹。保守的 ATR - Chk1 通路中,ATR 通过其重要结合伴侣 ATR 相互作用蛋白 (ATR interacting protein, ATRIP) 被招募于 RPA - ssDNA, 9 - 1 - 1 检查点钳 (Rad9 - Rad1 - Hus1 checkpoint clamp) 结合在 DNA 断裂双链和单链的连接处并招募介导蛋白 TopBP1,介导蛋白 Claspin 招募 Chk1 到 DNA 损伤位点从而使 ATR 能得以直接磷酸化 Chk1,而 TopBP1 与 ATR - ATRIP 复合体及 9 - 1 - 1 检查点钳中 Rad9 发生相互作用。ATR - ATRIP 的完全激活不能由 RPA - ssDNA 单独实现,还需要 TopBP1 的参与。

Kumagai 等在体外实验中发现 TopBP1 极大的增强 ATR 激酶活性。他们发现 TopBP1 与 ATR - ATRIP 复合体发生作用,TopBP1 的 ATR 激活区 (ATR - activating domain, AAD) 位于第 6、7BRCT 功能域之间, AAD 区本身足以异位激活 ATR 依赖性信号转导,而 AAD 区的单点突变即可使这一活性消失。Toledo 等实验也证实,将异位表达的 AAD 区从胞质重置于胞核后足以激活 ATR,在无 DNA 损伤的前提下过表达 AAD 区能够激活 ATR 而促进 Chk1、H2AX、Rad17 等底物的磷酸化。而 Liu 等实验发现下调 TopBP1 阻止了 ATR 激酶对 Chk1、Nbs1、H2AX 等底物的磷酸化。因此,TopBP1 激活 ATR 似乎是自然界的普遍现象, ATR 使众多底物磷酸化的活性需要 TopBP1 来充分激活。

TopBP1 激活 ATR - ATRIP 的具体机制尚不明确,一个可能机制是 TopBP1 类似于一个支架,联系众多蛋白聚集在 ATR 附近而被 ATR 磷酸化;另一可能机制是蛋白的共定位易化了 TopBP1 和 ATRIP 的相互作用,这使得 TopBP1 的 AAD 区能够接触 ATR,诱导了 ATR 激酶区构象的改变,因而底物能够被轻易磷酸化,也就是说结合 TopBP1 后 ATR - ATRIP 构象改变而促进激活^[4]。TopBP1 和 ATR - ATRIP 之间的相互作用是松散而短暂的,无 TopBP1 存在时 ATR 只有基本的激酶活性,只有在 TopBP1 结合以后 ATR - ATRIP 才是有活性的。经凝胶过滤使 TopBP1 从复合体分离以后,ATR - ATRIP 激酶活性又恢复到初始的较低水平^[18]。TopBP1 对 ATR 的有效激活,是细胞为了充分应对 DNA 损伤反应而进行信号放大的需

要。

TopBP1 和 ATRIP 的接触易化了 TopBP1 和 ATR 之间的相互作用。TopBP1 发生在 ATRIP 接触区的突变削弱了细胞从复制应激状态中恢复及诱导细胞周期阻滞的能力,从而使细胞活性下降。TopBP1 与 ATR 的 C 末端上的特异性 PIKK 调节区相互联系,发生在 ATR 调节区的突变不影响基本的激酶活性,但阻止了激酶的完全激活。ATR 强力激活需要 1989 位苏氨酸的自磷酸化,它反式发生于聚集在 RPA - ssDNA 的 ATR - ATRIP 复合体。自磷酸化的 1989 位苏氨酸能被 TopBP1 直接识别,使 TopBP1 能够稳定连接到 ATR - ATRIP 复合体、有效刺激 ATR 激酶及起到 ATR 与底物联系的支架作用。因此 DNA 损伤导致的 ATR 的完全激活需要 RPA - ssDNA、ATR 自磷酸化和 TopBP1 的连续性驱动。

四、TopBP1 在 DNA 损伤修复中的活性调节

由于与 TopBP1 的接触可触发 ATR 的激活,所以细胞中这两种蛋白的相互作用时机就需要严密控制。9 - 1 - 1 检查点钳能够调节 TopBP1 与 ATR 的接触,经 387 位丝氨酸磷酸化后 Rad9 结合 TopBP1 的第 2BRCT 功能域并将其引导到 ATR - ATRIP 的周围。细胞中 TopBP1 对 ATR 的激活刺激也依赖于 TopBP1 结合到损伤的 DNA 模板,Choi 等研究显示 TopBP1 是通过其 C 末端,包括 AAD 区和第 7、8 BRCT 功能域来结合 DNA 的。

DNA 损伤反应中 TopBP1 非常早就被招募到 DNA 损伤位点,并激活 ATR 激酶作用到几乎所有 ATR 靶点。现已明确在激活 ATR 方面并不要求对 TopBP1 蛋白进行转录后修饰,因为这种激活也发生在 TopBP1 重组体或单独 AAD 区。但是对于 TopBP1 蛋白定位区域和(或)浓度的不同,也可视为一种修饰调节。异位表达的 AAD 区会缺乏任何 DNA 结合活性,但当将其从胞质移至胞核后,又能够激活 ATR。所以,在正常细胞环境中,控制 ATR 的激活,可以通过调节 TopBP1 的定位而实现,或许也能通过调节溶解蛋白的浓度而实现。

在招募 TopBP1 到 DNA 损伤位点时存在多层控制机制:①TopBP1 能被信号识别蛋白,如 Rad9 招募到激活位点;②早期结合到 DNA 损伤位点的 Nbs1、53BP1、PARP - 1 都可能再与 TopBP1 结合,从而为 TopBP1 结合到损伤位点提供新途径;③体外实验也见 TopBP1 直接结合到诸如 DNA 断裂、单链 DNA 或大量加合物的 DNA 损害处^[4]。这种招募 TopBP1 的

冗繁机制是生物体逐渐进化中形成的,从而保证当基因组遇险时维护基因组保真度的通路能有效激活。

五、TopBP1 与乳腺癌的发生

DNA 损伤诱导的 DNA 修复和细胞周期检查点功能在抑制肿瘤发生方面有重要意义,特别是在 ATR - Chk1 通路上的蛋白出现功能异常后将促进恶性肿瘤的发生发展。有致癌作用的雌二醇 E₂ 和膜相关雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 内源性抑制了 ATR 级联转导信号引发的 G₂/M 检查点和快速 DNA 修复功能,因而更易促进乳腺癌的发生。由于 TopBP1 蛋白在细胞维持基因组稳定性,特别是 DNA 损伤修复中起重要作用,所以 TopBP1 基因变异导致的 TopBP1 功能异常也可能会增加乳腺癌的发病风险。

Karppinen 等在芬兰 125 个家族性乳腺癌和卵巢癌群体中筛查胚系 TopBP1 基因突变,发现杂合子 Arg309Cys 错义突变发生频率较健康对照组高,两者有明显的差异 (15.2% vs 7.0%, $P = 0.002$)。这种变异发生在 TopBP1 蛋白 N 末端接近第 2BRCT 功能域的进化保守序列区,与大约 2 倍的乳腺和(或)卵巢癌风险增高有关。但随后 Blaut 等在德国的调查研究认为 TopBP1 基因 Arg309Cys 变异并没有增加德国人患乳腺癌的风险。因而 TopBP1 基因多态性导致乳腺癌方面也存在争议,这方面的研究还需在更大范围及更多人种间进行。

组织学研究支持 TopBP1 蛋白在抑制乳腺癌方面的潜在作用。Going 等在未经选择的乳腺癌组织中发现 TopBP1 蛋白的异常表达:在普通乳腺组织 TopBP1 蛋白主要定位于细胞核,而在乳腺癌中表达方式多种多样,既有核染色、核浆同时染色,又有单纯胞质染色。类似的结果也分别见于猫科和犬科动物乳腺肿瘤中。既然乳腺癌组织中大多数的 TopBP1 过表达发生在胞核,TopBP1 因此能影响转录因子如 E2F1、p53 等的功能。

肿瘤抑制因子 p53 蛋白在应对 DNA 损伤时控制 G₁/S 检查点而使细胞周期阻滞于 G₁ 期,而在非应激状态下 p53 活性应维持在较低水平以利于细胞正常增殖。大多数人类肿瘤中 p53 是突变或失活的。Liu 等研究发现 TopBP1 的缺失上调了涉及细胞周期阻滞和凋亡的 p53 靶基因的活性,这种调节由 TopBP1 的第 7、8BRCT 功能域和 p53 的 DNA 结合区介导,抑制了 p53 的启动子结合活性。他们的研究显示 TopBP1 的过表达更易在三阴性乳腺癌中见到,且与较高肿瘤

分级和较短生存时间相关。TopBP1 过表达抑制了 p53 靶基因的表达,抑制了 DNA 损伤引发的细胞凋亡和 G₁ 期阻滞。因此,生理水平的 TopBP1 对正常 G₁/S 期转换是必要的,而肿瘤细胞中病理水平的 TopBP1 可能会扰乱 p53 功能而使肿瘤表现出侵袭性。

六、展 望

DNA 双链断裂引发的染色体不稳定促使肿瘤易感性增加,修复过程错误是有丝分裂的生长细胞产生染色体畸变的主要来源,这就要求有复杂的监督机制来保证正确的 DNA 修复重建。TopBP1 是重要的蛋白,除参与 DNA 损伤信号转导、细胞周期检查点控制及 DNA 修复功能外,还在 DNA 复制、转录及细胞分裂方面发挥作用,因而涉及细胞增殖和凋亡。TopBP1 的过表达与侵袭性乳腺癌相关,因而具有治疗意义,如将特异性的 TopBP1 抑制剂用于那些高表达 TopBP1 的乳腺癌患者,以重新激活 p53 依赖性的凋亡而增加疗效。随着研究的不断深入,针对 TopBP1 这一重要的 DNA 损伤修复蛋白的靶向药物有望研制成功,个体化的肿瘤预防和治疗手段也将在临床工作中逐步得到应用。

参考文献

- 1 Yamane K, Kawabata M, Tsuruo T. A DNA - topoisomerase - II - binding protein with eight repeating regions similar to DNA - repair enzymes and to a cell - cycle regulator[J]. *Eur J Biochem*,1997,250 (3):794 - 799
- 2 Garcia V, Furuya K, Carr AM. Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2005,4 (11):1227 - 1239
- 3 Leung CC, Glover JN. BRCT domains: easy as one, two, three[J]. *Cell Cycle*,2011,10(15):2461 - 2470
- 4 Sokka M, Parkkinen S, Pospiech H, *et al.* Function of TopBP1 in ge-

- nome stability[J]. *Subcell Biochem*,2010,50:119 - 141
- 5 Wollmann Y, Schmidt U, Wieland GD, *et al.* The DNA topoisomerase IIbeta binding protein 1 (TopBP1) interacts with poly (ADP - ribose) polymerase (PARP - 1)[J]. *J Cell Biochem*,2007,102(1):171 - 182
- 6 Jackson SP, Bartek J. The DNA - damage response in human biology and disease[J]. *Nature*,2009,461(7267):1071 - 1078
- 7 Summers KC, Shen F, Sierra Potchanant EA, *et al.* Phosphorylation: the molecular switch of double - strand break repair[J]. *Int J Proteomics*,2011,2011:Epub
- 8 Kinner A, Wu W, Staudt C, *et al.* Gamma - H2AX in recognition and signaling of DNA double - strand breaks in the context of chromatin[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008,36(17):5678 - 5694
- 9 Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, *et al.* The Mre11 - Rad50 - Nbs1 complex mediates activation of TopBP1 by ATM[J]. *Mol Biol Cell*,2009,20(9):2351 - 2360
- 10 Cescutti R, Negrini S, Kohzaki M, *et al.* TopBP1 functions with 53BP1 in the G1 DNA damage checkpoint[J]. *EMBO J*,2010,29 (21):3723 - 3732
- 11 Wang J, Gong Z, Chen J. MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control[J]. *J Cell Biol*, 2011,193(2):267 - 273
- 12 Boichuk S, Hu L, Makielski K, *et al.* Functional connection between Rad51 and PML in homology - directed repair[J]. *PLoS One*,2011,6 (10):e25814
- 13 Morishima K, Sakamoto S, Kobayashi J, *et al.* TopBP1 associates with NBS1 and is involved in homologous recombination repair[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,362(4):872 - 879
- 14 Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008,9(8):616 - 627
- 15 Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork[J]. *Biochem J*, 2011,436(3):527 - 536

(收稿:2012 - 04 - 29)

(修回:2012 - 05 - 22)

股骨头坏死的发病机制及干细胞治疗进展

吕玉明 程立明 裴国献

股骨头坏死 (osteonecrosis of the femoral head,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772194)

作者单位:510150 广州医学院第三附属医院骨科(吕玉明); 100029 北京,中日友好医院关节外科(程立明); 710032 西安,第四军医大学西京医院骨科(裴国献)

通讯作者:程立明,医学博士,主任医师,硕士生导师,电子信箱:zdc1m123@126.com;裴国献,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:nfperry@163.com

ONFH)亦称缺血性或无菌性股骨头坏死,好发于青壮年,病程进展迅速,如不积极治疗致残率高。股骨头坏死的发病机制有早期的脂肪栓塞学说、微血管内凝血学说和骨内高压学说等^[1]。股骨头坏死的主要诱因有激素、酗酒、创伤、凝血障碍和血管解剖畸形^[2]。股骨头坏死的主要类型激素性和酒精性股骨头坏死的细胞免疫因素是近年来的研究热点。本文对相关研究进展进行综述。