

多 ADP-核糖聚合酶家族

唐 剑 李祺福*

(厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室, 厦门 361005)

摘要 分离鉴定多功能的核基质蛋白及核基质结合蛋白是目前核基质研究的一个重要领域。通过与转录因子、核基质结合元件以及 DNA 间相互作用, 核基质结合蛋白在 DNA 复制、转录、加工修饰等细胞内事件中起着支持和调节的作用。多 ADP-核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]是一种高度保守的核基质结合蛋白, 在多种活动例如基因组损伤修复、细胞凋亡、信号转导、基因表达调控中都发挥着调节的功能。PARP 的潜在生物学功能已越来越引起国内外研究人员的关注。

关键词 核基质; 多 ADP-核糖聚合酶; 碱基切除修复

多 ADP-核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP, E.C.2.4.2.30]是哺乳动物细胞中一种含量较丰富的核基质结合蛋白, 目前已经鉴定的 7 种家族成员分别是: PARP-1、PARP-2、PARP-3、tankyrase-1、tankyrase-2、sPARP、vPARP。它们在结构上具有保守性, 都含有相同的催化结构域, 能够催化 ADP-核糖基团逐个从 NAD⁺ 上转移到多种底物分子例如组蛋白、核纤层蛋白、拓扑异构酶、DNA 聚合酶及自身。随后由另一种 PARP 甘油水解酶 PARG[poly(ADP-ribose) glycohydrolase]将多 ADP-核糖长链降解。经过这种 ADP-核糖循环机制, PARP 在 DNA 的损伤修复、DNA 复制、细胞增殖分化调控、细胞凋亡、基因组的稳定方面发挥着重要的作用(图 1)^[1]。目前 PARP 的功能及作用机制已经初步探明, 但是对整个 PARP 家族却缺乏比较性研究, 阐明 PARP 家族各成员的结构功能及其相互联系对于深入开展 PARP 研究及应用具有积极的意义。

1 PARP-1

1.1 PARP-1 的结构特点

PARP-1 是第一个被发现的具有多 ADP-核糖化功能的核基质蛋白, 也是迄今为止研究得最清楚的 PARP 家族成员。它的基因位于人染色体 1q42 上, 分子量为 113 kDa, 包含 3 个结构域: DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)、自我修饰结构域(automodification domain)以及催化结构域(catalytic

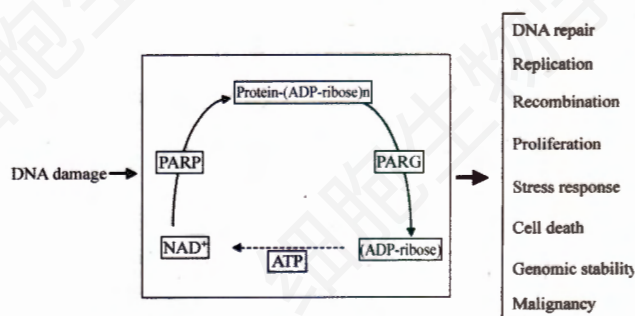


Fig.1 Model for the function of poly(ADP-ribosylation)^[1] (n=1, 2, 3...)

domain)^[2]。研究显示, DBD 位于 hPARP-1 分子的 N 末端, 此区域含有一个锌指结构及一个核定位信号, 推测与底物分子的结合有关; 自我修饰结构域位于中部, 含有一个 BRCT(breast cancer terminal box)框, 推测与 DNA 的结合有关; 位于 hPARP-1 C 末端的氨基酸序列则是其催化结构域, 含有一个 NAD⁺ 结合位点及催化活性位点(图 2)^[3]。

1.2 PARP-1 与碱基修复

针对外源刺激如电离辐射、紫外线、烷基化试剂、强氧化物等造成的 DNA 损伤, PARP-1 可以迅速结合于 DNA 断裂端, 催化自身多 ADP-核糖化, 当多 ADP-核糖链达到一定长度时, 多聚链即

收稿日期: 2003-10-31 接受日期: 2004-06-08

国家自然科学基金资助项目(No.30170724)

* 通讯作者。Tel: 0592-2185363, Fax: 0592-2181015, E-mail:

chifulee@163.net

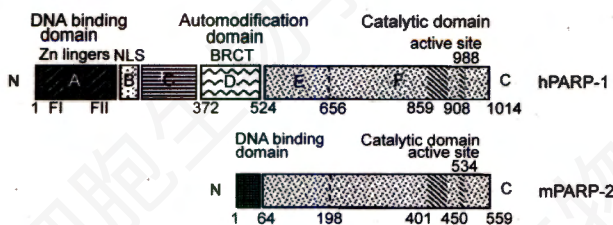


Fig.2 Schematic representation of the modular organization of human PARP-1 and mouse PARP-2^[3]

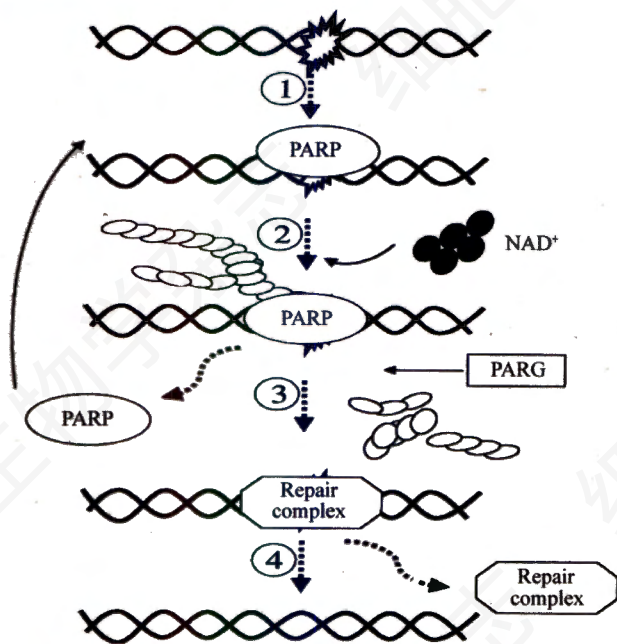


Fig.3 The biochemical pathway of poly(ADP-ribosylation)^[1]

PARP primarily represents PARP-1 here. ① PARP binds rapidly to DNA strand breaks; ② formation of long, branched poly(ADP-ribose) polymers on target proteins, principally itself, using NAD⁺ as a substrate; ③ degraded by poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG); ④ permitting access of the DNA repair machinery to the lesion and its repair.

被降解并介导碱基切除修复(base excision repair, BER)复合体识别并修复DNA损伤(图3)^[1,4]。

1.3 PARP-1 与细胞凋亡

研究表明,在细胞凋亡进程中,可以检测到PARP-1被caspase-3特异地裂解为85 kDa和25 kDa的两个肽段,并且失去了与DNA结合的能力。同时,由于凋亡过程大量断裂DNA的存在,使得PARP-1催化底物分子上合成过多的ADP-核糖,NAD⁺大量被消耗,从而导致细胞内能量水平的急剧下降,凋亡受到抑制^[5,6]。由此可见,PARP-1的裂解有利于凋亡的顺利进行,它在细胞凋亡中起着负调控的作用。

1.4 PARP-1 与转录因子

体外实验证实,PARP-1能与抑癌蛋白p53结合,两者结合的部位分别是PARP-1的N末端及p53的C末端序列。抑制PARP-1的活性会导致小鼠胚胎纤维原细胞p53含量水平的下降。而在PARP-1基因缺失的细胞中,当用药物抑制蛋白质的核质转运时,p53蛋白含量随即升高。推测可能的机制是PARP-1通过与p53的核输出序列(nuclear export sequence, NES)结合抑制了p53的核输出^[7]。此外,PARP-1还可以与NF-κB结合,在体内,两者以复合物的形式对依赖NF-κB的基因的转录起着协同激活的作用^[8]。进一步阐明PARP-1的作用机制对于其在肿瘤发生及药理学上的应用具有潜在的重要性。

2 PARP-2

PARP-1基因缺失实验证实,小鼠成纤维细胞受到外源刺激如紫外线、烷基化试剂作用时,仍然可以检测到多ADP-核糖链的合成,随后分离出了一种具有催化活性的核基质蛋白,称之为PARP-2。它的基因位于人染色体14q11.2~q12上,含有16个外显子及15个内含子,长度约为13 kb,蛋白质分子量为62 kDa。与hPARP-1不同的是,mPARP-2中缺少自我修饰结构域,N末端的DBD也仅含有一个核定位信号,缺少了锌指结构及BRCT框(图2)。虽然PARP-2中并不含有明显的DNA结合元件,但是其N末端DBD中含有丰富的酸性氨基酸残基lys及Arg,使其能够与DNA或其他碱性分子非特异性结合,发挥其催化功能。此外,对小鼠PARP-2基因启动子的研究显示,PARP-2基因与组蛋白H1 RNA基因紧密相连,两者的转录起始位点仅相距114 bp,它们通过一个双向的启动子分别介导两者的转录和表达。然而PARP-1基因却不与任何基因共享启动子,其组织方式具有管家基因的典型性:缺少TATA框,GC序列较丰富^[9],表明PARP-2与PARP-1的表达调控很可能由不同的机制所介导。

通过比较PARP-2与PARP-1的功能还发现:PARP-2的催化活性也具有外源损伤依赖性,但是当DNA受到损伤断裂时,PARP-2的活性仅有PARP-1的1/10,在BER过程中,推测两者是以异二聚体的形式共同发挥催化功能^[10,11]。关于PARP-2活化的确切机制及功能还有待于进一步研究。

3 PARP-3

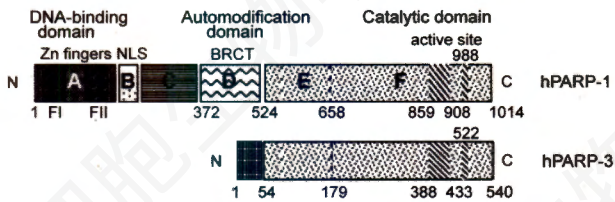


Fig.4 Schematic representation of the functional domains of hPARP-1 and hPARP-3^[12]

1999年 Johansson 等发现了另一种与 PARP-1 及 PARP-2 具有同源性的蛋白质 PARP-3(60 kDa), 并利用反转录技术克隆了其 cDNA 序列。研究表明, PARP-3 由 540 个氨基酸残基组成, 其 N 末端缺少了 DNA 结合域及自我修饰结构域, C 末端的催化结构域与 PARP-1 有 61% 的序列同源性(图4), 编码 hPARP-3 的基因位于人染色体 3p21.1~3p21.3 上^[12]。

在整个细胞周期中, hPARP-3 都存在于有丝分裂的中心体尤其是中心粒中, 推测 PARP-3 在细胞周期调控中发挥作用。Augustin 等^[12]进一步证实, hPARP-3 参与了细胞周期检控点的调控, 它具有阻滞细胞 G₁/S 期进程的作用。最近还发现, PARP-3 在中心体中可以与 PARP-1 以异二聚体的形式发挥协同的作用。有关 PARP-3 亚细胞水平的精确定位及其活化机制还有待阐明。

4 Tankyrase-1 与 Tankyrase-2

Tankyrase-1 是第一个在端粒中被检测出来的具有催化 ADP-核糖化活性的蛋白酶, 它是一个 142 kDa 的多功能蛋白质, 其蛋白质结构与锚蛋白 (ankyrin) 及 PARP-1 都具有同源性。然而其催化活性仅有 PARP-1 的 1/150。分子生物学研究显示, tankyrase-1 含有一个富含组氨酸-脯氨酸-丝氨酸 (histidine-proline-serine, HPS) 的结构域, 推测为特异受体的结合位点; 中部含有几个锚蛋白基因重复片段 (ankyrin repeats, ANK) 及一个 SAM (sterile alpha module) 框; 末端为与 PARP 同源的催化结构域 (图5)^[13,14]。在大多数肿瘤细胞中, tankyrase-1 均能催化 TRF1 (一种端粒维持所需的负调控因子) 的 ADP-核糖化, 抑制 TRF1 与端粒 DNA 的结合, 从而有利于端粒酶与端粒复合物结合并发挥作用。

Tankyrase-2 与 tankyrase-1 具有很大的同源性, 两者结构上的不同之处仅存在于 N 末端氨基酸序列: Tankyrase-2 不含有 HPS 结构域。两者在细胞内的分布有很大的不同, tankyrase-2 除了可能存在

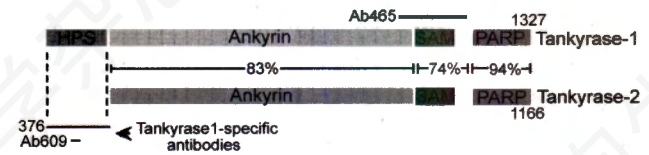


Fig.5 Schematic representation of tankyrase-1 and -2^[14]
Ab, antibody. HPS, homopolymeric tracts of histidine, proline, and serine. SAM, sterile alpha module. PARP primarily refers to PARP-1 here.

于端粒复合物中外, 还可存在于高尔基复合体、核孔复合体以及中心体中。体外实验表明, tankyrase-2 可以自我修饰或以 TRF1 为受体发挥其催化活性, 小鼠成纤维细胞核内 tankyrase-2 的过量表达会导致 TRF1 从端粒上释放出来。有人认为, tankyrase-1 与 tankyrase-2 可以分别和 TRF1 二聚体的两个亚基相结合^[14,15]。然而, 至今还没有关于 tankyrase-2 核内定位的报道, 推测可能是由于尚未鉴定出 tankyrase-2 分子内的特异抗体的结合域(类似 tankyrase-1 中的 HPS), 因此无法有效地利用抗体技术进行鉴定。

5 vPARP

Vault 是哺乳动物细胞中一种小的核糖核蛋白复合体, 由少量的 RNA 及 3 种分子量分别为 100 kDa、193 kDa 和 240 kDa 的蛋白质所组成。100 kDa 的组分又称之为 MVP (major vault protein) 蛋白, 占复合体的 70% 左右。193 kDa 的组分称为 vPARP (vault PARP)。蛋白质序列分析显示, 它具有一个与 PARP-1 催化结构域 28% 同源性的末端序列, 由 350 个氨基酸组成, 并可以在 DNA 损伤诱导下催化多 ADP-核糖链的形成。免疫荧光检测实验显示, vPARP 是一种新型的 PARP, 它的蛋白质结构域中一部分位于 vault 复合体, 另一部分位于细胞核内以及有丝分裂过程中的纺锤体。现已证实 vault 复合体结合于核孔复合体附近, 发挥蛋白质及其他大分子物质转运“通道”的功能, 推测 vPARP 是以 MVP 为催化底物, 调控大分子物质的核质转运^[16]。

6 sPARP-1

最近从 PARP-1 基因缺失的胚胎期小鼠的成纤维细胞中分离出一种具有 PARP 催化活性的短的多肽, 由 493 个氨基酸残基组成, 分子量为 55.3 kDa, 称之为 sPARP-1 (short PARP-1)。放射自显影实验显示, sPARP-1 与 PARP-1 极有可能是同一

个基因表达的产物。Sallmann 等^[17]证实,用 DNase I 处理细胞后 PARP-1 的活性显著提高,而 sPARP-1 的活性则无变化,表明 sPARP-1 活性不依赖于 DNA 损伤。尽管如此,sPARP-1 仍然可以为多种外源性损伤如紫外线,强氧化剂等强烈激活,提示 PARP-1 与 sPARP-1 可能通过不同的途径应答 DNA 损伤。目前有关 sPARP-1 结构与功能的描述尚少。

参考文献 (References)

- [1] Herceg H *et al.* *Mutat Res*, 2001, **477**: 97
- [2] D'Amours D *et al.* *J Cell Sci*, 2001, **114**: 3771
- [3] Ame JC *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 17860
- [4] Leppard J *et al.* *Mol Cell Biol*, 2003, **23**: 5919
- [5] Boulares AH *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 22932
- [6] Burkle A *et al.* *Chembiochem*, 2001, **2**: 725
- [7] Wesierska-Gadek J *et al.* *J Cell Biochem*, 2003, **89**: 220
- [8] Hassa PO *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 45588
- [9] Saxena A *et al.* *Hum Mol Genet*, 2002, **11**: 2319
- [10] Schreiber V *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 23028
- [11] Menissier de Murcia J *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 2255
- [12] Augustin A *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 1551
- [13] Rippmann JF *et al.* *J Mol Biol*, 2002, **323**: 217
- [14] Cook BD *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 332
- [15] Smith S *et al.* *Science*, 1998, **282**: 1484
- [16] Kickhoefer VA *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **146**: 917
- [17] Sallmann FR *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 15504

Poly(ADP-ribose) Polymerase Family

Jian Tang, Qi-Fu Li*

(Institute of Cell Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract It's an important field on separating and identifying functional nuclear matrix protein and nuclear matrix binding protein in research of the nuclear matrix nowadays. Through interacting with transcriptional factors, nuclear matrix binding elements and DNA, nuclear matrix binding protein plays a supporting and regulative role on DNA replication, transcription and modification. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is a kind of nuclear matrix binding protein of high conservation, and functions in areas such as repairing of genome damage, cell apoptosis, signal transduction, gene expression and regulation. Focus has been placed on its potential biological functions increasingly.

Key words nuclear matrix; poly(ADP-ribose) polymerase; base excision repair

Received: October 31, 2003 Accepted: June 8, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170724)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2185363, Fax: 86-592-2181015, E-mail: chifulee@163.net