

12 Fisher K J, Choi H, Burda J *et al.* Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, 1996, **217** (4): 11~ 22

13 McCoy R D, Davidson B L, Roessler B J *et al.* Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: effects on vector induced inflammation. *Gene Therapy*, 1995, **2** (4): 437~ 442

14 Dmatteo R P, Raper S E, Ahu M *et al.* Gene transfer to thymus a means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. *Annals of surgery*, 1995, **222** (3): 229~ 242

The Improvements of Adenovirus Vectors in Efficacy and Safety. LIU Xue-feng, ZHANG Liang-feng, WANG Li-hua, CAI You-yu (*Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College & Chinese*

Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China).

Abstract Adenoviruses are efficient gene transfer vectors for variety of cell types *in vivo*. The first-generation recombinant adenoviruses that lack E1 sequences have shown tremendous promise in animal and human models of gene therapy. Having some limitations at aspect of efficacy and safety, the adenovirus vectors are being gradually improved to resolve these problems. The developments of construction of adenovirus vectors in increasing the efficacy and safety was described.

Key words adenovirus vector, safety, efficacy

MAR 结合蛋白

周丛照 钱信果 李振刚*

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230027)

摘要 MAR (matrix association regions) 是真核基因组的 DNA 序列中可特异性地与核基质紧密结合的区域. MAR 通过特异性地与一些 MAR 结合蛋白相互作用, 在真核基因的复制和表达调控以及染色体的包装构建等方面发挥重要作用. MAR 结合蛋白主要包括一些构成染色质或核基质的结构蛋白 (如组蛋白 H₁、拓扑异构酶 I 和 II、HMG I/Y、Lamin B₁、Matrin 等) 以及一些组织特异性表达的蛋白 (如 SATB₁、骨钙蛋白基因启动子结合因子等). 根据它们与核基质的关系将 MAR 结合蛋白分为三类: 核基质富含组分、核基质稀有组分以及非核基质组分, 对其与 MAR 的相互作用进行了比较和分析.

关键词 MAR, 核基质, MAR 结合蛋白

学科分类号 Q71, Q75

在真核生物的细胞核中广泛存在一种三维网架结构, 主要由非组蛋白的纤维蛋白和高分子质量的 RNA 组成, 这就是所谓的核基质 (nuclear matrix). MAR (matrix association regions) 是真核基因组的 DNA 序列中能特异性地和核基质紧密结合的区域, 一般长约 300 ~ 1 000 bp, 主要由 A-box、T-box、ATATTT (T) 序列以及与果蝇拓扑异构酶 II 位点相近的同义序列等特征序列组成. MAR 通过将染

色质锚定在核基质上而使染色质 DNA 形成拓扑学限制性的 DNA 环 (loop). 每个 DNA 环既是一个转录单位, 也是一个复制单位和染色体包装单位, MAR 位于这些基本单位的交界处, 邻接于一些调控元件. 由于其高 A+ T 含量 (70% 左右) 和 oligo (dA) 序列, MAR 易

收稿日期: 1997-04-21, 修回日期: 1997-09-03

* 通讯联系人.

于弯曲和单链化. 正是通过自身的解链而在 DNA 环中引入负超螺旋^[1], MAR 才能对转录的起始进行正调控. MAR 不同于经典的增强子, 它对内源基因的表达没有增强作用, 但对稳定整合到宿主细胞染色体上的外源基因却表现出明显的转录增强作用^[2].

滴定实验发现, 核基质上的结合位点可以被 MAR 饱和, 即核基质上的 MAR 结合位点是有限的. 通常每个核基质上有约 20 000 个 MAR 结合位点, 其中一半位于核基质的内部, 另一半则位于核基质的外围——即核壳 (nuclear shell) 上^[3]. 这些位点中有一半可以识别单链 DNA, 因此认为 MAR 与核基质的相互作用在某种程度上取决于核基质对单链 DNA 的识别^[4].

对于 MAR 与核基质之间的相互作用一直存在争议. 怀疑论者认为, 无论在体内还是体外实验中, MAR 与核基质之间的相互作用都是不同于生理环境的实验条件所造成的人为假象. 为了提供更有说服力的证据, 人们开始把注意力转移到 MAR 结合蛋白 (MAR-binding proteins) 上. 由于 DNA 与蛋白质之间的相互作用及其一系列实验手段已经为大家所接受, 只要找到某些蛋白质——证明它们既可以和 MAR 紧密结合, 又是核基质的组分, 那么这些 MAR 结合蛋白就是 MAR 与核基质相互作用的有力的间接证据.

目前已经纯化和鉴定的 MAR 结合蛋白共 10 余种, 可分为三类: 核基质的富含组分、核基质的稀有组分和非核基质组分.

1 核基质的富含组分

核基质中含量最丰富的两种蛋白质组分为 Lamin 和 Matrin. Lamin 位于核基质的外围靠近核膜的区域, 而 Matrin 则位于核基质的内部. 实验证明, Matrin 3、Matrin 4、Matrin D-G、Matrin 12 和 13 都是 MAR 结合蛋白^[5], 这暗示 Matrin 为核内染色体 DNA 的包装提供了大量而准确的支点. Hakes 等^[6]发现编码 matrin F/G 全部 544 个氨基酸残基的 cDNA 长

约 2.7 kb, 从 cDNA 序列可知 matrin F/G 中约含 50% 的亲水氨基酸, 因此其二级结构表现为大量的 β 折叠, 其中含有的两个 DNA 结合模体 (motif) 均为锌指结构. Lamin 中目前只发现 Lamin B₁ (60~70 ku, 酸性) 可以与 MAR 特异性结合^[3], 而且它们之间的相互作用在进化上是高度保守的, 这为核内 DNA 与核纤层 (nuclear lamina) 的相互作用提供了有力的实验证据.

拓扑异构酶 II 和高迁移率非组蛋白 HMG I/Y 也能与 MAR 特异性结合. 早在 1984 年 Mirkovitch 等就已发现 MAR 中含有与果蝇拓扑异构酶 II 位点相近的 DNA 同义序列, 并由此推测 MAR 与拓扑异构酶 II 一起控制染色质结构域的拓扑结构. 但直到 1989 年才证实拓扑异构酶 II 是一种 MAR 结合蛋白^[7]. 它特异性地与 MAR 上的拓扑异构酶 II 位点结合后, 使 MAR 发生解旋而将负超螺旋引入 DNA 环, 而负超螺旋有利于转录因子与启动子的结合. 拓扑异构酶 I (分子质量为 95~100 ku) 也可与核基质选择性结合. HMG I/Y 与其他 HMG 分子的不同之处就在于 HMG I/Y 可以在体内和体外与由富含 A+T 所形成的 DNA 小沟特异性结合^[8], 体外结合实验表明, HMG I/Y 的结合可使线性双链 DNA 弯曲和解链, 也可将超螺旋引入环状质粒 DNA 中. 这种特异性结合是由于 HMG I/Y 对 DNA 二级结构而不是碱基序列的识别, 它更易识别位于核小体表面的 A+T 富含区, 并介导 DNA 在一些核小体表面的定位替换^[9].

2 核基质的稀有组分

包括一些稀有的启动子结合因子 (rare promoter-binding factors)、SATB₁ (special AT-rich binding protein)、ARBP (attachment region binding protein)、SAF-B (scaffold attachment factor B)、SAF-A/hnRNP U (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U) 等. 这些蛋白尽管在核基质中含量较少, 但仍对 MAR 的功能发挥着非常重要的调控作用.

成骨细胞中的一种组织特异性的 MAR 结合蛋白——NMP-1 和 NMP-2 (nuclear matrix protein), 均与骨钙蛋白 (osteocalcin) 基因的启动子区域 (nt - 640~ - 430) 特异性紧密结合^[10]. NMP-1 是一种与转录因子 ATF (activating transcription factor) 有关的受细胞生长调控的蛋白, 同时存在于核基质和非核基质部分; NMP-2 则是一种细胞类别特异性的启动子结合因子, 分子质量为 38 ku, 绝大部分位于核基质. 最近发现, 大鼠成骨细胞特异性的骨钙蛋白基因的启动子有三个相同的 NMP-2 的 DNA 结合域: A (nt - 605~ - 599)、B (nt - 441~ - 435)、C (nt - 135~ - 130), 序列为 T (A) GT (C) GGT, 这三个位点同时也是 AML-1 (acute myelogenous leukemia 1) 识别序列; 但 NMP-2 并非与 AML 是同一蛋白, 而是 AML 的一种变异体^[11].

ARBP 在每个细胞核中约有 100 000 个拷贝, 位于核基质的内部, 分子质量约为 95 ku. 缺失突变证明, ARBP 可与短至 350 bp 的富含 A+T 的 MAR 片段有效结合^[12], 更短的 MAR 片段与 ARBP 的结合能力明显降低. 鸡溶菌酶基因 MAR 中有两个 ARBP 结合位点, 其 DNA 模体均由核心序列 5'-GGTGT-3' 及其侧翼的富含 A+T 序列组成^[13]. MAR 二联体与 ARBP 的结合具有协同作用, 其结合效率较 MAR 单体提高约 7 倍, 且该协同作用不受其间插入片段大小的影响.

SATB₁ 是一种组织特异性蛋白, 主要在胸腺中表达, 分子质量为 85.9 ku. 其 cDNA 长 2 946 bp, 由 215 bp 的 5' 非翻译序列和编码 763 个氨基酸的开放阅读框组成^[14]. SATB₁ 特异性地识别 ATC 序列, 以较小面积与超螺旋 DNA 的小沟相接, 结合区域表现出稳定的不配对现象. 若通过特异性突变降低该解链特性, 则 MAR 与 SATB₁ 的结合能力大大减小.

SAF-A 和 SAF-B 是发现于 HeLa 细胞的一组 MAR 结合蛋白中含量较为丰富的两个, 富含于染色质, 是核基质的稀有组分. 后来发现, SAF-A 其实就是 von Kries 等发现的一种

MAR 结合蛋白 hnRNP U, 分子质量为 120 ku^[15]. 这说明 SAF-A/hnRNP U 具有双重功能, 它不仅是 hnRNP 颗粒的组分之一, 而且参与了染色质高级结构的组织. 与 SAF-A 有效结合的最短 MAR 片段为 700 bp 左右, 大都由易于形成四链结构的 poly (G) 和 poly (I) 组成. SAF-B 有 849 个氨基酸残基, 分子质量为 96.7 ku, 是一种随机的管家型染色质蛋白^[16].

3 非核基质组分

至今所鉴定的 MAR 结合蛋白中唯一不是核基质组分的就是组蛋白 H₁, 它在染色质的包装和活化方面具有非常重要的作用. 组蛋白 H₁ 主要是识别 MAR 上的富含 A+T 序列而与 DNA 小沟结合的. 若人工合成 oligo (dA) • oligo (dT) 链, 只要它长于 130 bp, 即可与组蛋白 H₁ 特异性紧密结合. 组蛋白 H₁ 对转录具有抑制作用, MAR 通过调节组蛋白 H₁ 的聚集来控制染色质结构域 (chromatin domain) 的形成, 从而促进转录的进行^[17].

组蛋白 H₁ 和核基质富含的四种 MAR 结合蛋白 (Lamin B₁、Matrin、拓扑异构酶 I 和 II、HMG I/Y) 以及核基质中含量较少的 SAF-A 和 B 不仅是构成核基质或染色质的重要的结构蛋白, 而且通过与 MAR 的特异性结合对染色质的包装构建以及基因的活化和表达进行调控, 因此它们同时也是重要的功能蛋白. 这一方面反映了生物体的高效节能, 同时也体现了生物大分子结构和功能的高度统一. 另外一些核基质中含量较少的 MAR 结合蛋白主要是一些组织特异性蛋白 (如 NMP-1 和 2、SATB₁), 它们决定了核基质与某些 MAR 序列的特异性结合, 从而导致位于该 MAR 侧翼的 DNA 环中基因的组织特异性表达.

参 考 文 献

- 1 Cockerill P N, Garrard W T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II site. Cell, 1986, 44 (2): 273~ 282

- 2 Klehr D, Maass K, Bode J. Scaffold-attached regions from the human interferon β domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry*, 1991, **30** (5): 1264~ 1270
- 3 Luderus M E E, de Graaf A, Mattia E *et al.* Binding of matrix attachment regions to lamin B₁. *Cell*, 1992, **70** (6): 949~ 959
- 4 Kay V, Bode J. Binding specificity of a nuclear scaffold: supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached region DNA. *Biochemistry*, 1994, **33** (1): 367~ 374
- 5 Nakayasu H, Berezney R. Nuclear matrices: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (13): 10312~ 10316
- 6 Hakes D J, Berezney R. Molecular cloning of matrix F/G: a DNA binding protein of the nuclear matrix that contain putative zinc finger motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (8): 6186~ 6190
- 7 Adachi Y, Kas E, Laemmli U K. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J*, 1989, **8** (11): 3997~ 4006
- 8 Saitoh Y, Laemmli U K. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell*, 1994, **76** (4): 609~ 622
- 9 Reeves R, Wolffe A. Substrate structure influences binding of the non-histone protein HMG-I/Y to free and nucleosomal DNA. *Biochemistry*, 1996, **35** (15): 5063~ 5074
- 10 Bidwell J P, van Wijnen A J, Fey E G *et al.* Osteocalcin gene promoter-binding factors are tissue-specific nuclear matrix components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (4): 3162~ 3166
- 11 Merriman H L, van Wijnen A J, Hiebert S *et al.* The tissue-specific nuclear protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/runt domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry*, 1995, **34** (40): 13125~ 13132
- 12 von Kries J P, Buhrmester H, Stratling W H. A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell*, 1991, **64** (1): 123~ 135
- 13 Buhrmester H, von Kries J P, Stratling W H. Nuclear matrix protein ARBP recognizes a novel DNA sequence motif with high affinity. *Biochemistry*, 1995, **34** (12): 4108~ 4117
- 14 Dickinson L A, Joh T, Kohwi Y *et al.* A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell*, 1992, **70** (4): 631~ 645
- 15 von Kries J P, Buck F, Stratling W H. Chicken MAR bind-

ing protein p120 is identical to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) U. *Nucl Acid Res*, 1994, **22** (7): 1215~ 1220

- 16 Renz A, Fackelmayer F O. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucl Acid Res*, 1996, **24** (5): 843~ 849
- 17 Kas E, Izaurralde E, Laemmli U K. Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J Mol Biol*, 1989, **210** (2): 573~ 585

MAR-binding Proteins. ZHOU Cong-zhao, QIAN Xin-guo, LI Zhen-gang (*Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*).

Abstract Matrix association region (MAR) is the DNA sequences in eukaryotic genome which can specifically associate with the nuclear matrix. By means of specific interaction with some MAR-binding proteins, MAR plays important roles in eukaryotic gene's replication, expression and regulation, and chromosomal construction. MAR-binding proteins include some structural proteins in chromatin or nuclear matrix (such as histone H₁, topoisomerase I & II, HMG I/Y, lamin B₁, and matrices.) and some tissue-specifically expressed proteins, including SATB₁ (special AT-rich binding protein 1) and osteocalcin gene promoter-binding factors. By the relationship with the nuclear matrix, these MAR-binding proteins can be classified in three groups, nuclear matrix-abundant composition, rare composition and non-nuclear matrix composition. Their interactions with MARs were compared and analyzed as well.

Key words matrix association region (MAR), nuclear matrix, MAR-binding proteins