

聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶*

——在 DNA 损伤修复及程序性死亡中的作用

罗 瑛 孙志贤 吴祖泽

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 是存在于多数真核细胞中的一个蛋白质翻译后修饰酶, 它可催化组蛋白 H₁ 等重要核蛋白及它自身的聚腺苷二磷酸核糖基化作用. 细胞受到外界损伤因子作用时, DNA 发生链断裂, PARP 结合到 DNA 断裂口, 其催化活性被激活, 修饰受体蛋白, 进而引发一系列级联反应. 这种性质使 PARP 有可能作为细胞内的分子感受器和传感器, 启动细胞内对损伤作出反应的信号传导机制, 从而根据细胞受损程度决定细胞的命运: 修复或是死亡.

关键词 聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶, DNA 损伤修复, 程序性细胞死亡

聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP, EC2.4.2.30) 是存在于多数真核细胞中的一个蛋白质翻译后修饰酶, 它以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 为底物, 催化其裂解为腺苷二磷酸核糖基 (ADP-ribose) 和尼克酰胺两部分, 并将前者转移至受体蛋白的谷氨酸残基上, 该酶连续作用便给蛋白分子接上了一条腺苷二磷酸核糖基的聚合链 (可有支链), 这种修饰被称为蛋白质的聚腺苷二磷酸核糖基化作用^[1]. 研究表明, 组蛋白 H₁、拓扑异构酶 I、II、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、DNA 连接酶和 Ca²⁺·Mg²⁺ 依赖的核酸内切酶等多种核蛋白都是 PARP 的受体蛋白, 因此推测 PARP 可能与细胞内 DNA 的复制、转录和损伤修复等一系列主要的分子学事件有关. 值得注意的是, 该酶可对自身进行聚腺苷二磷酸核糖基化作用, 为其功能的可调性提供了基础.

Janakidevi 等^[2]首先发现 PARP 的活性依赖于 DNA 链断裂的存在 (冈崎片段例外), 不同的链断裂方式对酶的激活效应不同, 平末端的双链断裂是最有效的激活剂, 它的激活效

应是 3' 突出的粘末端双链断裂的 3 倍, 是 5' 突出的粘末端双链断裂和单链断裂的 10 倍; 而共价、闭合和环状 DNA (cccDNA) 的激活效应几乎为零. 由此可推知, PARP 的激活是与 DNA 所受的损伤程度相关的, 损伤越重, PARP 的活性越强. 随后发现 DNA 损伤剂作用细胞可导致 PARP 活性的升高, 并以此解释了 DNA 损伤剂导致细胞内 NAD⁺ 浓度降低的原因. 足迹法 (footprinting) 研究表明激活的 PARP 特异地结合在 DNA 断裂口上. 由此, 人们推测在细胞受到外界损伤因子 (如化学药物、射线和热等) 作用时, DNA 发生链断裂, PARP 结合到 DNA 断裂口, 其催化活性被激活, 修饰受体蛋白, 进而发生一系列级联反应, 使细胞对外界刺激作出应答.

有意义的是, PARP 的自我催化功能使其可以调节自己与 DNA 的结合, 如果 PARP 自身成为腺苷二磷酸核糖基的受体, 被聚腺苷二磷酸核糖基化的 PARP 就因电荷排斥作用而从 DNA 上脱落下来. 另外, Sugimura 等^[3]发

*国家自然科学基金资助.

收稿日期: 1995-09-13, 修回日期: 1995-10-25

现细胞中存在与 PARP 功能相拮抗的酶: 聚腺苷二磷酸核糖基糖水解酶 (poly (ADP-ribose) glycohydrolase), 它能打断聚腺苷二磷酸核糖基链中两个核糖间的连键, 从而把聚腺苷二磷酸核糖基链水解为单个腺苷二磷酸核糖基; 聚腺苷二磷酸核糖基组蛋白裂解酶 (ADP-ribose histonelyase), 它能打断核蛋白与聚腺苷二磷酸核糖基长链间的连键, 使蛋白去修饰. 它们与 PARP 相互调节的动态平衡关系可能对 PARP 的功能有重要影响.

上述特点表明 PARP 有可能作为细胞内的有效地监测 DNA 损伤的分子感受器而起作用, 因此, 有人把 PARP 称为细胞内的分子感受器^[4] (molecular sensor). 如果说 PARP 是分子感受器, 那么, 它引发的信号传递级联反应是什么? 其效应器及细胞学后果又是什么? 如果 PARP 不只是分子感受器, 它又是怎样参与随后的 DNA 修复过程或调控细胞进入死亡程序的呢? 围绕这个问题, 近来已有不少研究报道, 本文主要就 PARP 在细胞损伤修复及程序性死亡中的作用进行探讨.

1 PARP 的分子结构

PARP 酶分子由一条多肽链组成, 分子质量为 116 ku, 等电点在 8.0~9.8. 按各部功能可分为三个区: DNA 结合区, 自身修饰区和催化活性区; 按其线性结构可分为 A、B、C、D、E 和 F 六个区域: A 区主要包含两个锌指结构, F I 和 F II, 可能参与识别 DNA 断裂, 并与之结合. 精细研究表明, 第一个锌指参与识别 DNA 单链和双链断裂, 它的突变会大大降低 DNA 单链和双链断裂对 PARP 的激活作用; 第二个锌指则只参与识别 DNA 单链断裂. B 区为核定位信号序列 (nuclear localization signal, NLS), 由两个碱性部分 (bipartite) 组成, 其作用是引导酶蛋白进入细胞核内. C 区功能不明. D 区为自身修饰区, 即在该区与腺苷二磷酸核糖基结合, 发生自身聚腺苷二磷酸核糖基化. 近来推测它还有使酶分子形成二聚体的功能, 这一区域在序列上具有较

大的种间变异性. E、F 为 NAD⁺ 结合和催化区, 其序列高度保守, 第 859~908 氨基酸区段在脊椎动物中的保守性达 100%. 另外, 有研究认为 PARP 还具有亮氨酸拉链结构, 推测它在 PARP 与其他蛋白的作用或 PARP 形成自身二聚体时发挥功能.

应用足迹法研究发现, PARP 与 DNA 的结合保护了 DNA 切口 (nick) 两端各 7 ± 1 个核苷酸, 使其免受 DNA 酶 I 的降解, 而 PARP 的 DNA 结合区只能结合 1.5 个双链螺旋 (约 7 个核苷酸), 因此, 很有可能 PARP 以二聚体的形式分别结合在 DNA 切口的两端. 用硫酸二甲酯作用于 PARP-DNA 复合物, DNA 链上的鸟嘌呤被降解, 表明二者的结合不具有碱基特异性, 因而不能保护碱基. 这些研究初步揭示了 PARP-DNA 相互作用的模式^[5].

2 PARP 在细胞损伤修复中的作用

如上所述, PARP 在细胞 DNA 受损时被激活, 因而 PARP 是一种 DNA 损伤应激蛋白, 且可能与 DNA 损伤修复相关.

Wilmer 等^[6]报道了在突变的 CHO 细胞中, 由于 PARP 的活性降低, 导致细胞对 DNA 烷化剂的敏感性增强. 表明 PARP 在细胞对损伤的抗性方面起着重要作用. 另一方面, Fritz 等^[7]在 CHO 细胞中过量表达人的 PARP 后发现, 细胞对烷化剂诱变的抗性增加.

那么, 这种作用的机理是什么呢? 我们的研究表明, PARP 的抑制剂 3-氨基苯甲酰胺 (3-AB) 作用于细胞, 可增加细胞染色质的松散程度, 加重细胞受 γ 射线照射后的初始损伤, 提示 PARP 在维护染色质空间结构的紧密性, 从而减轻细胞受照后的初始损伤方面起作用. 研究发现 3-AB 明显地延迟了 DNA 链断裂重接的现象, 表明 PARP 可能促进 DNA 损伤的修复; 进一步研究表明 PARP 只能促进修复电离辐射、烷化剂所致 DNA 损伤, 对紫外照射损伤的修复无作用, 表明 PARP 主

要参与碱基切除修复 (base excision repair, BER), 而与核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 无关^[8]. 用反义 RNA 技术抑制细胞内 PARP 活性, 可得到 PARP 的反义细胞, 对这种细胞的研究表明, 细胞的倍增时间比对照细胞增加一倍, 核染色质对 DNA 酶 I 的敏感性增强, 表明其核内染色质紧密性受到破坏. 同样, 研究者也发现反义细胞延迟了对 DNA 损伤的修复^[9]. Molinete 等^[10]在细胞中过度表达 PARP 的 DNA 结合区, 这样的细胞不能进行烷化剂诱导的 DNA 损伤修复. 以上研究表明 PARP 通过与 DNA 结合, 并激发活性, 参与 DNA 损伤修复.

Satoh^[11]等发展了一个能方便、有效地研究 PARP 在 DNA 损伤修复中的作用的无细胞系统, 他们以活性的全细胞抽提液 (去除 DNA、 NAD^+) 为酶反应体系, 以定量损伤的质粒 DNA 为激活因子来研究 PARP 的作用. 研究表明, 在缺乏 NAD^+ 的情况下, 体系不能有效地重接 DNA 链断裂, 加入纯化的 DNA 连接酶也无效果, 而加入 NAD^+ 或去除体系中的 PARP 皆可促进修复. 这一研究表明, PARP 并不直接参与 DNA 损伤修复, 相反, 它与 DNA 的牢固结合还阻碍了后续的修复酶的作用, 只有通过 NAD^+ 提供的腺苷二磷酸核糖基发生自修饰作用, 才能暴露出损伤部位, 使修复酶得以靠近. 因此, 修复是发生在 PARP 结合之后的事件, PARP 抑制剂对 DNA 损伤修复的抑制作用很可能在于延长了 PARP 与 DNA 的结合过程. 有关 PARP 在损伤修复中的精细的分子学过程尚有待更深入的研究.

此外, 如前所述, 聚腺苷二磷酸核糖基糖水解酶在调节 PARP 的功能方面起着重要作用. 研究表明^[12], PARP 在与 DNA 断裂结合后被激活, 通过自我修饰从 DNA 上脱落下来而失活, 再经聚腺苷二磷酸核糖基糖水解酶的作用去修饰, 重新获得 DNA 结合能力, 并再次激活. 这种周期性的 DNA 结合与脱落可能有利于修复酶与 DNA 断裂处的结合, 从而利于损伤修复. 进一步的研究认为, 与 DNA 结

合的 PARP 由于自修饰形成的聚腺苷二磷酸核糖基链带有很强的负电荷, 可与 DNA 竞争结合组蛋白 H_1 , 从而导致 H_1 从 DNA 上脱落, 使 DNA 结构松散, 损伤位点暴露出来, 利于修复; 也有研究认为 PARP 直接修饰组蛋白, 使之带过多负电荷而脱落. 更有研究认为 PARP 与 DNA 断裂的结合起着固定 DNA 游离末端, 防止随机转录、DNA 重组、姐妹染色单体交换等事件的发生, 而在 DNA 连接酶作用前即完成其使命, 脱离 DNA^[13].

PARP 在 DNA 损伤发生后的分子作用过程可概述于图 1^[4].

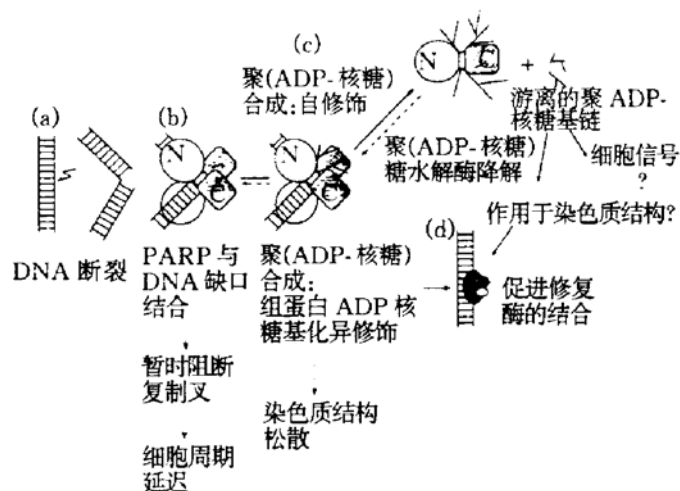


图 1 DNA 损伤后 PARP 作用模式^[4]

Wang 等^[14]用转基因技术成功地建立了 PARP 缺陷型小鼠. 缺陷小鼠没有明显的外观变化, 它的胚胎纤维母细胞能有效地修复紫外和烷化剂造成的损伤, 但原代培养的纤维母细胞生长缓慢, 在小鼠受 γ 射线照射后, 胸腺细胞不能增殖, 且小鼠对皮肤病易感. 从这一结果来看, PARP 似乎不是细胞修复损伤的唯一途径.

综上所述, PARP 可应 DNA 断裂而激活, 因此在细胞 DNA 损伤修复中起着重要作用, 但它是否直接参与 DNA 链断裂的修复还需提供更多的直接证明, 现有的研究倾向于认为它在 DNA 修复中起调节作用. 除 PARP 之外是否还存在其他的修复途径, 它们之间的关系如何? 这些问题都有待于深入研究.

3 PARP 在细胞程序性死亡中的作用

由于 PARP 的应激行为, 即它能感受外界刺激造成的 DNA 损伤, 并有可能传递信息给其他分子, 引起后续反应. 因此, 它在细胞程序性死亡中的作用已成为研究者关注的问题.

PARP 在损伤细胞中的激活, 导致细胞内 NAD^+ 浓度的下降, 且与细胞受损程度正相关. 因此, 有些研究者认为严重的损伤造成的胞内 NAD^+ 浓度的急剧下降及能量耗净是细胞程序性死亡的重要因素, 研究表明^[15], 细胞内 NAD^+ 浓度的下降与细胞程序性死亡的发生在时相上有一定的相关性, 用 3-AB 可抑制 NAD^+ 浓度的降低, 减少程序性死亡的细胞, 但这种现象只在即刻发生 DNA 断裂的损伤中存在. 另有研究发现锌离子可阻止聚腺苷二磷酸核糖基的合成并抑制肿瘤化疗药 VP-16 (etoposide) 诱导的 DNA 片段化. 上述研究似乎表明 PARP 可促进细胞程序性死亡.

Negri 等^[16]发现, VP-16 诱导 HeLa 细胞程序性死亡过程中, 胞内被自身修饰的 PARP 大量增加, 由此推测 PARP 的自我修饰是细胞程序性死亡的一个重要特点. 同时, Kaufmann 等^[17]的研究表明, 在化疗药物、 γ 射线和蛋白合成抑制剂处理 HL-60 细胞程序性死亡中, 恰好在 DNA 电泳梯状图谱出现之前, PARP 被水解为两个片段, 分子质量分别为 85 ku 和 25 ku. 如果用特定的蛋白水解酶抑制剂保护 PARP, 则 DNA 电泳梯状图谱不再出现, 同时, 与程序性死亡相关的细胞形态改变也不发生. 另外, 用 3-AB 作用细胞只能延缓 NAD^+ 的消耗, 不能推迟 PARP 的裂解和 DNA 的片段化. 这一研究表明 PARP 的裂解可能是启动程序性死亡的关键, 或许程序性死亡中的这种蛋白水解是激活胞内的 DNA 内切酶的必由之路.

进一步的研究表明^[18], 裂解位点的天冬氨酸 (Asp) 残基是水解酶识别的关键位点, 这样的水解酶只有 IL-1 β 转化酶 (interleukin-

1 β converting enzyme, ICE) 和颗粒酶 B (granzyme B). 现已确定, PARP 是被 ICE 家族的 ICH-2 催化裂解的, 而 ICE 家族分子与细胞进入死亡程序密切相关: 研究表明, ICE 是线虫细胞死亡基因 *ced-3* 的类似物, ICE 在介导 Fas (胞膜蛋白, 亦即 CD95) 配基诱导的程序性死亡中起关键作用. ICE 与 *ced-3*、ICH-1、ICH-2 或 ICE 类似的蛋白酶 (pr ICE) 共同组成了 ICE 家族. 它们的共同抑制剂可阻断细胞的程序性死亡, 表明 ICE 家族分子是细胞程序性死亡调控中的重要分子. 它们的作用可能是通过 p53 介导的基因调控的级联反应而产生相应效果的, 可被 bcl-2 阻断. 这一发现引出了一个复杂的网络体系, 通过 PARP、ICE 家族、Fas、p53、bcl-2 等分子的相互作用, 把 DNA 断裂与细胞程序性死亡有机地联系起来, 提示从 DNA 断裂到细胞死亡之间可能存在一条分子相互作用的信号传递途径.

但 Li 等^[19]对 ICE 缺陷的转基因小鼠的研究表明, 小鼠对外源毒性刺激的抗性提高, 而其胸腺细胞和巨噬细胞可正常进行程序性死亡, 说明 ICE 不是程序性死亡的惟一途径, 是否存在其他途径, 它们之间是否形成网络调节, 尚待研究.

以上研究表明, PARP 可能启动了细胞从损伤到死亡这一途径的信号传递, 通过 ICE、p53 等分子的级联反应, 使细胞进入死亡程序, 最终导致细胞程序性死亡. 对这一过程中的分子网络的深入研究, 可使我们对程序性死亡的分子调控有一明晰的认识, 从而指导肿瘤及其他相关疾病的防治.

综上所述, 细胞在受到外源毒性因子刺激时, 胞内 DNA 的损伤可激发应激蛋白如 PARP 的活性, 结合到 DNA 断裂上, 并被激活. 这种形式使它能作为细胞内自测损伤的分子感受器而起作用, 感受 DNA 的损伤程度, 并通过自我修饰、聚腺苷二磷酸核糖基糖水解酶的作用及 ICE 的水解作用来传递这一信息, 使细胞根据受损程度作出相应的反应: 损伤不

严重时, 诱导细胞进入生长休止状态, 修复损伤, 以利于细胞功能的恢复; 损伤严重时则放弃修复, 使细胞进入死亡程序。因为对严重受损的细胞的修复不仅要消耗细胞的大量能量, 而且由于修复的出错率较大, 很有可能形成突变细胞, 成为肿瘤的潜在细胞, 危及整体的生存。这也是生命行为的高度有效性所决定的。这种信号转导体系和分子调节网络的存在, 使细胞损伤修复和程序性死亡成为一个问题的两个方面, 二者间的相互协调有利于生命的延续和进步, 其协调性的丧失则可能导致肿瘤发生等恶疾, 对这一体系的进一步认识和确证还需要大量的研究工作。

参 考 文 献

- 1 de Murcia G, de Murcia J M, Schreiber V. *BioEssays*, 1991; **13**: 445
- 2 Janakidevi K, Koh C. *Biochemistry*, 1974; **13**: 1327
- 3 Sugimura T, Miwa M. *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 5
- 4 de Murcia G, de Murcia J M. *TIBS*, 1994; **19**: 172
- 5 de Murcia G, Schreiber V, Molinete M *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 15
- 6 Witmer M V, Aboul-Ela N, Jacobson M K *et al.* *Mutat Res*, 1994; **314**: 249
- 7 Fritz G, Auer B, Kaina B. *Mutat Res*, 1994; **308**: 127
- 8 Satoh M S, Lindahl T. *Cancer Res*, 1994; **54**: 1899s
- 9 Ding R C, Pommier V, Kang V H *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 12804
- 10 Molinete M, Vermeulen W, Burkle A *et al.* *EMBO*, 1993; **12**: 2109
- 11 Satoh M S, Lindahl T. *Nature*, 1992; **356**: 356
- 12 Althaus F R, Hofferer L, Kleczkowska H E *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 53
- 13 Chatterjee S, Berger N A. *Mol Cell Biochem*, 1994; **138**: 61
- 14 Wang Z Q, Auer B, Stingl L *et al.* *Gene and Development*,

- 1995; **9**: 509
- 15 Nosseri C, Coppola S, Ghibelli L. *Exp Cell Res*, 1994; **212**: 367
- 16 Negri C, Bernardi R, Ricotti G C B A *et al.* *Carcinogenesis*, 1993; **14**: 2559
- 17 Kaufmann S H, Desnoyers S, Ottaviano Y *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 3976
- 18 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S *et al.* *Nature*, 1994; **371**: 346
- 19 Li P, Allen H, Banerjee S *et al.* *Cell*, 1995; **80**: 401

Poly (ADP-ribose) polymerase: Its Role in the Repairing of DNA Damages and Programmed Cell Death. Luo Ying, Sun Zhixian, Wu Zuze (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is a kind of enzyme which responsible for posttranslation modification of proteins. It exists in many eukaryotic cells and catalyzes poly ADP-ribosylation of nuclear proteins including histone H₁ and itself. When cells are damaged by toxic agents that induce DNA breakages, PARP molecules will bind to DNA breakage and their catalytic activity is activated. Then they modify their acceptor protein and trigger a set of cascade reactions. Thus PARP is a possible molecular sensor and transducer to initiate the signal transferring path for reacting to damages of the cell. The information which they passed may decide the fate of a cell; repair or death.

Key words poly (ADP-ribose) polymerase, DNA damage repair, programmed cell death

抗体库的发展及未来

王 学 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 抗体库的出现为制备人源性单抗开辟了一条行之有效的途径。虽然该技术问世只有短短几年的