论文

中国知名大学及研究院所专栏 复旦大学生命科学学院专辑

拟南芥多聚 ADP 核糖水解酶在 ATM 和 ATR 依赖的 DNA 损伤信号途径中的作用分析

杨立峰, 潘维扬, 葛晓春*

复旦大学生命科学学院, 生物化学与分子生物学系, 上海 200438

* 联系人, E-mail: xcge@fudan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-12; 接受日期: 2016-02-07

国家自然科学基金(批准号: 31170169, 31070232)资助

摘要 DNA 损伤响应是生物体感知 DNA 断裂并启动 DNA 修复过程的重要机制, 对维护遗传物质的稳定性具有重要的意义. DNA 损伤响应机制中有多种蛋白的参与. 多聚 ADP 核糖水解酶(PARG)是参与蛋白质多聚 ADP 核糖化(poly(ADP-ribosyl)ation)修饰调控过程的一种重要酶, 它通过水解去除蛋白质上的多聚 ADP 核糖来调节靶蛋白质的生理生化活性. 目前已知多聚 ADP 核糖修饰相关蛋白可能通过修饰 DNA 修复相关蛋白参与 DNA 损伤反应, 但其影响的信号途径和上下游关系并不清楚. 本研究通过双突变体构建、遗传以及表达谱分析, 揭示了 PARG1 可能在 DNA 损伤响应途径关键激酶 ATM 和 ATR 的上游, 通过调节 ATM 和 ATR 的活性来反馈调节 DNA 损伤信号途径.

关键词 多聚 ADP 核糖水解酶, 蛋白质修饰, DNA 损伤, 信号途径

生物在生长发育过程中会遭遇各种各样的生物或者非生物因素的胁迫, 保持遗传物质的稳定性对于生物的遗传和发育过程具有重要的意义. 例如, 阳光中的紫外线一天之内可以在一个细胞中造成多达十万次的 DNA 损伤^[1]. 损伤产生大量的嘧啶二聚体, 如果不被修复, 最终会导致 DNA 链中的胞嘧啶被胸腺嘧啶所取代. 离子辐射也会导致 DNA 双螺旋结构中的单链断裂(single-strand breaks, SSBs)或者双链断裂(double-strand breaks, DSBs)^[2]. 在漫长的进化过程中, 生物体进化出了一系列复杂而又严密的 DNA 修

复机制用以修复 DNA 损伤. 如碱基切除修复(base excision repair, BER)、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、同源重组修复(homologous recombination, HR)、非同源末端连接修复(non-homologous end joining, NHEJ)等^[3-6].

DNA 损伤响应(DNA damage response, DDR)是生物体进化出的保持遗传物质稳定性的重要机制. 在动物细胞中, ATM(ataxia-telangiectasia mutated)和 ATR(ATM- and Rad3-related)是 DNA 损伤响应系统的关键激酶, 它们是 PIKKs(phosphatidylinositol-3-

引用格式: 杨立峰, 潘维扬, 葛晓春. 拟南芥多聚 ADP 核糖水解酶在 ATM 和 ATR 依赖的 DNA 损伤信号途径中的作用分析. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 449-457
Yang L F, Pan W Y, Ge X C. Analysis of the role of *Arabidopsis* Poly(ADP-ribose) glycohydrolase in ATM- and ATR-dependent DNA damage response signaling pathways. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 449-457, doi: 10.1360/N052016-00103

kinase-like kinase)激酶家族的重要成员^[7], 分别调控着双链及单链 DNA 损伤反应. ATM 和 ATR 参与了 BER, HR 和 NHEJ 等多种修复途径. 当细胞 DNA 产生双链断裂时, 细胞中存在的 MRN(Mre11-Rad50-Nbs1)复合体被募集到断裂处, MRN 募集并激活 ATM, 进而激活下游的细胞周期检查点激酶 2(checkpoint kinase 2, Chk2), p53 等相关的蛋白^[8,9]. 而复制蛋白 A(replication protein A, RPA)则可以结合到由于复制叉停止所产生的单链 DNA 上, 形成 RPA-ssDNA 复合体, 复合体可以与 ATRIP (ATR-interacting protein)结合, 从而募集 ATR, 进而激活下游的 Chk1, p53 等^[10]. 与动物中相同, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)中也包含着 ATM 与 ATR 两条途径. 不同的是, 拟南芥中并没有找到 ATM 和 ATR 下游的肿瘤蛋白 p53 结合蛋白 1(tumor protein p53 binding protein 1, 53BP1)、DNA 损伤检查点调控因子 1(mediator of DNA damage checkpoint 1, MDC1)、细胞周期检查点激酶 1(checkpoint kinase 1, Chk1), Chk2, p53, Claspin 等的同源蛋白^[9]. ATM 信号途径与 ATR 信号途径尽管激活方式不一样, 但两者的信号途径之间存在交叉. 许多下游基因, 既受 ATM 的调控, 也受到 ATR 的调控.

多聚 ADP 核糖化(poly(ADP-ribosylation)是蛋白质翻译后修饰的一种方式, 是调控蛋白质活性和功能的重要手段. 多聚 ADP 核糖聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase) PARP 以 NAD⁺为底物, 将其 ADP 核糖基团连接到目的蛋白, 反复多次连接后形成长度不一的带有分枝的多聚 ADP 核糖链(poly(ADP-ribose), PAR), 从而改变蛋白质的生理生化活性^[11]. 研究表明, 它参与了细胞中 DNA 修复、程序性细胞死亡、转录和细胞周期调控等过程^[12-14].

当细胞中有 DNA 缺口或者双链断裂的时候, PARP 可以被激活, 发生自我修饰, 通过形成的 PAR 链募集参与 DNA 修复的酶, 如 X 射线修复交叉互补基因 1(X-ray repair cross-complementing 1, XRCC1), DNA 连接酶等^[15]. 当 DNA 损伤严重到无法修复时, PARP 可以通过两种方式引起细胞死亡. 其一是 PARP 过度激活, 导致其底物 NAD⁺过度消耗, 使 ATP 水平急剧下降, 细胞发生坏死(necrosis); 另一种方式是, PARP 介导一种新型的死亡方式 parthanatos, 它不依赖于细胞凋亡蛋白(caspase)的激活, 但受线粒

体中凋亡蛋白 AIF(apoptosis inducing factor)调控^[16]. 除此之外, 研究也发现 PARP 在其他方面发挥着非常重要的作用, 如调节染色质结构、调控基因表达等^[17,18].

PARG(poly(ADP-ribose) glycohydrolase)是催化多聚 ADP 核糖化修饰逆反应的酶, 它有内切和外切水解酶两种活性, 可以切除靶蛋白上的 PAR 并将 PAR 降解为单 ADP 核糖^[19]. 哺乳动物只含有一个 PARG 基因, 但有 4 种不同的剪切体并在细胞中不同的位置发挥着不同的功能^[20]. 研究发现, 敲除所有 PARG 剪切体的小鼠(*Mus musculus*)胚胎致死^[21].

在拟南芥中, 有两种 PARG 蛋白, PARG1 和 PARG2^[22], 但 PARG1 在降解体内 PAR 上发挥主要作用^[22,23]. PARG1 可以调控拟南芥的生理周期和开花, 并且影响拟南芥的免疫反应^[22]; 还有研究表明它在生物体抵抗干旱、渗透和氧化胁迫的过程中也发挥了作用^[24]. 早期研究表明, ATM 与 ATR 调控着拟南芥 PARP1 和 PARP2 的表达^[25,26]. 最新的研究发现, 相比 PARPs, PARG1 在拟南芥细胞生存过程中发挥着更重要的作用, PARG1 的表达受 ATM 和 ATR 的调控, 但反过来亦可影响 ATM 和 ATR 的表达^[23], 但 PARG1 究竟如何调控 DNA 损伤响应的关键激酶 ATM 和 ATR 并不清楚. 利用实验室已有的 PARG1, ATM 和 ATR 基因的单突变体, 通过杂交获得了 PARG1 与 ATM 或者 ATR 基因的双突变体, 通过遗传表型并结合转录水平分析进一步阐明了 PARG1 在拟南芥 DNA 损伤信号途径中的作用.

1 材料与方法

1.1 植物材料与生长条件

实验中用到的所有拟南芥都为 Col 生态型. 突变体 *atm-1* 和 *atr-2*(SALK_032841)来自于比利时根特大学 De Veylder 教授实验室^[27], 突变体 *parg1-4* (SALK_012110)订自 ABRC(Arabidopsis Biological Resource Center, <http://www.arabidopsis.org>)网站, 它们均属于 T-DNA 插入突变体. 拟南芥生长条件为直接种植于土里或者点播在 1%蔗糖的 1/2 MS 固体培养基上, 4℃同步化 48 h 后, 转移至 22℃的长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)温室中培养.

1.2 拟南芥突变体 *parg1-4* 分别与 *atm-1*, *atr-2* 的杂交

以拟南芥突变体 *parg1-4* 作为父本, 分别与母本的 *atm-1* 或 *atr-2* 进行杂交. 杂交时选取拟南芥未开的花苞进行去雄, 第二天再进行授粉, 授粉成功后种植 F_1 代植物并收取种子, 将种子播种后得到 F_2 代植株并鉴定其基因型是否为双突变体.

1.3 拟南芥 DNA 的提取及 T-DNA 插入突变体的鉴定

剪取拟南芥野生型和突变体的叶片, 利用 CTAB 法提取 DNA, 并以此为模板进行 PCR 鉴定. 鉴定用到的引物有 8 个. 其中的 LP1, RP1, LBb1.3 用来鉴定 *PARG1* 基因的突变体, LP2, RP2, LBb1.3 用来鉴定 *ATR* 基因的突变体, TAG3, ATM104, ATM123 用于鉴定 *ATM* 基因的突变体. 引物序列如下:

LBb1.3: 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3';
LP1: 5'-TTTGTAGGATGATCCAACCG-3';
RP1: 5'-CGGAGGTGGTTCCTAAGTAG-3';
LP2: 5'-GCAGCAAAAATTTCTTGGTTG-3';
RP2: 5'-ACTTCAAGGGTCCGATGTTC-3';
TAG3: 5'-CTGATACCAGACGTGCCCCGCATA-

A-3';

ATM104: 5'-TGGCAGCCGAGTATTTTCAACT-TT-3';

ATM123: 5'-ATGAACTTGGAAGGGTTACAA-GA-3'.

利用实时定量 RT-PCR 技术鉴定突变体相应突变基因的表达水平.

RNA 水平鉴定引物:

ATM-F: 5'-CAAGAGGAGTTCGAGGGAAAC-3';
ATM-R: 5'-GGCCATGTATGCTTCTCATCT-3';
PARG1-F: 5'-CCTCGGATGGATGACAATGAA-3';
PARG1-R: 5'-CAGCAAACCGAAACGAAGATG-

3';

ATR-F: 5'-GCTTTGTGGACATTGCTGATAC-3';
ATR-R: 5'-CAGGAAGATCCTCGGCATTT-3'.

1.4 拟南芥野生型和突变体材料的处理

拟南芥种子灭菌后点种在正常或者含有基因毒剂的 1/2 MS 平板上. 含 zeocin 的平板中, zeocin 浓度为 50 或者 100 $\mu\text{g/mL}$. 含甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)的平板中, MMS 浓度为

78 $\mu\text{g/mL}$. 4℃冷处理 48 h 后, 转移至 22℃的长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)温室中竖直培养 14 天后再观测表型. 用于 RNA 水平分析的材料于正常平板中生长 14 天左右, 再用 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 zeocin 喷洒处理.

1.5 叶绿素含量测定

取平板上的拟南芥幼苗称重, 在液氮中磨碎后, 用丙酮与无水乙醇体积比为 95:5 的提取液提取叶绿素, 并通过 UV1102 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)测量 A_{645} 和 A_{663} 来计算出叶绿素含量^[28].

1.6 RNA 提取和实时定量 RT-PCR

用 Trizol(TaKaRa, 大连)法提取拟南芥中总 RNA, 再利用 PrimeScript RT-PCR Kit with gDNA eraser 试剂盒(TaKaRa)将 RNA 反转录成 cDNA, 然后用 SyBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒(TaKaRa)进行实时定量 RT-PCR(qRT-PCR). 实验中用到的引物如下:

BRCA1-F: 5'-TCTTGGAAGACAAAGAGC-3';
BRCA1-R: 5'-AAGAAACAGGCCGCCTAC-3';
RAD51-F: 5'-AAACCCAGCACGGACCTTTC-3';
RAD51-R: 5'-AGCATCCCTAAGCTTCTTTACA-TCAA-3';

KU70-F: 5'-GGTGTAGCTGCTCCTCGCGC-3';

KU70-R: 5'-GCATAGTGTCTCTGCAAAGCGG-G-3';

PARG1-F: 5'-CGGATGGATGACAATGAAGCT-3';

PARG1-R: 5'-ATGTACTCACCAGCAACCGAA-A-3'.

2 结果

2.1 双突变体 *parg1-4 atm-1* 和 *parg1-4 atr-2* 的鉴定

突变体是研究基因功能及不同基因之间关系的重要材料. 为了研究拟南芥 *PARG1* 基因与 *ATM*, *ATR* 的关系, 获取了 3 个基因的 T-DNA 插入突变体 *parg1-4*, *atm-1* 和 *atr-2*, 通过 *parg1-4* 突变体与 *atm-1* 和 *atr-2* 的分别杂交, 获得了 F_1 代杂合突变体. F_1 代经自交, 获得了 F_2 代有分离的种子.

提取 F_2 代植物的 DNA, 经过 PCR 鉴定后, 获得了纯合的 *parg1-4 atm-1*, *parg1-4 atr-2* 两种双突变体(图 1). 对两种突变体进行 RNA 水平鉴定后发现, 突变体 *parg1-4 atm-1* 中的 *PARG1* 基因和 *ATM* 基因(图

图1 双突变体 *parg1-4 atm-1* 和 *parg1-4 atr-2* 的基因型鉴定

A: 双突变体 *parg1-4 atm-1* 的 PCR 鉴定结果. 上图为鉴定 *PARG1* 基因的 T-DNA 插入突变, 下图为鉴定 *ATM* 基因的 T-DNA 插入突变; B: 双突变体 *parg1-4 atr-2* 的 PCR 鉴定结果. 上图为鉴定 *PARG1* 基因的 T-DNA 插入突变, 下图为鉴定 *ATR* 基因的 T-DNA 插入突变

2A 和 C)以及突变体 *parg1-4 atr-2* 中的 *PARG1* 基因和 *ATR* 基因(图 2B 和 D)的表达均大大下降. 从 DNA 水平和 RNA 水平的鉴定结果表明, 成功得到了双突变体 *parg1-4 atm-1* 和 *parg1-4 atr-2*.

2.2 双突变体 *parg1-4 atm-1* 表型分析

PARG1 基因与 *ATM* 基因都参与了 DNA 修复, 通

过比较双突变体 *parg1-4 atm-1* 与单突变体 *parg1-4* 和 *atm-1* 在 DNA 损伤胁迫条件下的植物生长状况可以判断两个基因之间的关系. Zeocin 主要造成细胞 DNA 双链断裂, 而 MMS 是一种烷化剂, 主要造成 DNA 单链断裂和复制叉终止^[29]. 将拟南芥 Col 野生型以及突变体 *parg1-4*, *atm-1*, *parg1-4 atm-1* 分别生长于 1/2 MS 平板、低浓度 zeocin(50 $\mu\text{g/mL}$)平板、高浓度 zeocin(100 $\mu\text{g/mL}$)平板以及 MMS 平板上, 发现在正常条件下, 4 种拟南芥的生长状况基本一致. 在低浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)和高浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)zeocin 平板上, 它们之间的生长状况产生了差异. 在低浓度 zeocin 处理条件下, 野生型叶片为深绿色, 突变体 *parg1-4* 为浅绿色, *atm-1* 为黄色而双突变体 *parg1-4 atm-1* 叶片颜色则介于 *parg1-4* 与 *atm-1* 之间(图 3A 和 B); 而在高浓度 zeocin 平板上, 野生型拟南芥叶片为绿色而 3 种突变体叶片均变黄(图 3A 和 C). 此外, 还可以发现用 zeocin 处理后双突变体和 *atm-1* 的根比野生型和 *parg1-4* 长. 用 MMS 处理后, 从根长上比较, 野生型生长情况相对较好, *atm-1* 次之, *parg1-4* 最小, 而双突变也是介于 *parg1-4* 与 *atm-1* 之间(图 3A 和 D). 通过双突变体与单突变体表型的比较, 可以推测 *PARG1* 与 *ATM* 基因所参与信号途径有不同之处, *ATM* 是 DNA 损伤信号途径中的上游调节因子, 但 *PARG1* 基因在修复过程中的作用并非全然依赖于 *ATM* 激酶,

图2 双突变体 *parg1-4 atm-1* 和 *parg1-4 atr-2* 的 RNA 水平鉴定

A: 野生型、突变体 *parg1-4* 及 *parg1-4 atm-1* 中 *PARG1* 基因表达水平; B: 野生型、突变体 *parg1-4* 及 *parg1-4 atr-2* 中 *PARG1* 基因表达水平; C: 野生型、突变体 *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 中 *ATM* 基因表达水平; D: 野生型、突变体 *atr-2* 及 *parg1-4 atm-1* 中 *ATR* 基因表达水平. **: 与野生型中相应基因表达量相比, t 检验 $P < 0.01$

图 3 野生型、单突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及双突变体 *parg1-4 atm-1* 在正常条件下及 zeocin 或者 MMS 处理条件下的生长状况
A: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 在不同条件下生长表型; B: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 在正常情况及 50 µg/mL 的 zeocin 处理条件下叶绿素含量统计; C: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 在正常情况及 100 µg/mL 的 zeocin 处理条件下叶绿素含量统计; D: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 在正常情况及 MMS 处理条件下根长统计. *与**分别表示与野生型相比, *t* 检验 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

可能还参与了其他信号途径. 在 MMS 平板上, *parg1-4 atm-1* 的表型比 *atm-1* 表型更严重, 说明在单链断裂情况下, PARG1 蛋白可能调控 ATM 激酶活性; 但在双链断裂的情况下, 双突变表型更接近于 *atm-1* 单突变, 说明这种情况下 ATM 激酶可能调控 PARG1 的功能.

2.3 双突变体 *parg1-4 atr-2* 表型分析

比较双突变体 *parg1-4 atr-2* 与单突变体 *parg1-4* 和 *atr-2* 的生长状况, 发现在正常条件下, 野生型与突变体 *parg1-4*, *atr-2*, *parg1-4 atr-2* 的生长状况非常接近, 但在低浓度的 zeocin 条件下, *parg1-4 atr-2* 双突变和 *parg1-4* 单突变体植株表型接近, 相比野生型根更加短小, *atr-2* 与野生型差别不大(图 4A 和 B); 在高浓度 zeocin 条件下, 双突变体与 *parg1-4* 单突变体

的表型也类似, 叶片较野生型变黄, 叶绿素含量更低, 而 *atr-2* 突变体则介于野生型与 *parg1-4* 突变体之间(图 4A 和 C); 在 MMS 条件下, 野生型根长最长, *atr-2* 突变体次之, 而 *parg1-4* 与双突变 *parg1-4 atr-2* 彼此相似, 根较短. 在 zeocin 和 MMS 条件下, PARG1 功能的缺失导致植物产生了比 ATR 功能缺失更严重的基因毒剂敏感性, *parg1-4 atr-2* 双突变体的表型更接近于 *parg1-4* 单突变体的表型, 说明 PARG1 基因很有可能调控 ATR 基因的功能, 值得进一步研究.

2.4 双突变体中 DNA 修复相关基因诱导表达水平检测

为了更深入地了解两种突变体在受到基因毒剂胁迫条件下的变化情况及探究 PARG1 与 ATM 和 ATR 之间的关系, 检测了野生型、突变体 *parg1-4*, *atm-1*,

图 4 野生型、单突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及双突变体 *parg1-4 atr-2* 在正常条件下及 zeocin 或者 MMS 处理条件下的生长状况
A: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及 *parg1-4 atr-2* 在不同条件下生长表型; B: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及 *parg1-4 atr-2* 在正常情况及 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 zeocin 处理条件下根长统计; C: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及 *parg1-4 atr-2* 在正常情况及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 zeocin 处理条件下叶绿素含量统计; D: Col-0、突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及 *parg1-4 atr-2* 在正常情况及 MMS 处理条件下根长统计. *与**分别表示与野生型相比, t 检验 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

atr-2 及 *parg1-4 atm-1*, *parg1-4 atr-2* 中参与 DNA 修复的关键基因 *BRCA1* (breast cancer 1, AT4G21070), *RAD51* (radiosensitivities to γ -rays 51, AT5G20850) 和 *KU70* (Lupus Ku autoantigen p70, AT1G16970) 在 zeocin 处理之后的表达情况. *BRCA1* 与 *RAD51* 为同源重组修复的关键基因, 而 *KU70* 基因通常被认为是细胞非同源末端连接修复的重要标志^[30-32]. 本课题组发现, 参与非同源末端连接修复的重要基因 *KU70* 的表达水平在不同突变体中差异并不大(图 5C 和 F). 然而, 与同源重组修复相关的重要基因 *BRCA1* 与 *RAD51* 受到 zeocin 诱导后在不同突变体中的表达谱不一致. *BRCA1* 基因是 ATM 信号途径的下游基因, 其表达不依赖于 ATR 激酶, 而 *RAD51* 基因则同时受 ATM 和 ATR 信号途径的调控. 在 *parg1-4 atm-1* 双突变体中, *BRCA1* 和 *RAD51* 基因表达水平更接近于

atm-1 单突变体中的水平(图 5A 和 B); 而在 *parg1-4 atr-2* 双突变体中, *RAD51* 基因的表达水平更接近于 *parg1-4* 单突变体, *BRCA1* 基因的表达则比两个单突变体中都更低(图 5D 和 E). 说明在双链断裂下, ATM 激酶非常关键, 可能在 PARG1 的上游; 而在单链断裂情况下, ATR 和 PARG1 都参与了作用, PARG1 则可能调控 ATR 激酶功能. 这种推测也与单双突变体的表型比较一致.

3 讨论

在拟南芥中, 关于多聚 ADP 核糖化修饰相关蛋白参与 DNA 损伤响应信号途径的了解并不多. 已有研究表明, DNA 损伤响应途径中关键激酶 ATM, ATR 调控了 *PARP1* 和 *PARP2* 的表达, 在受到离子射线刺

图 5 双突变体 *parg1-4 atm-1* 和 *parg1-4 atr-2* 中 DNA 修复相关基因受 zeocin 诱导的表达水平变化

A~C: 分别为野生型、突变体 *parg1-4*, *atm-1* 及 *parg1-4 atm-1* 中 *BRCA1*, *RAD51*, *KU70* 3 种基因的表达水平相对于零时刻野生型中各基因的表达水平变化; D~F: 分别为野生型、突变体 *parg1-4*, *atr-2* 及 *parg1-4 atr-2* 中 *BRCA1*, *RAD51*, *KU70* 3 种基因的表达水平相对于零时刻野生型中各基因的表达水平变化; 每组实验重复 3 次. *与**分别表示与野生型相比, *t* 检验 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

激后, *atm*, *atr* 突变体中 *PARP1* 和 *PARP2* 的诱导表达受到明显抑制^[33], 但 *ATM*, *ATR* 和 *PARG1* 之间究竟存在何种关系还没有阐明. 本课题在前期研究发现, 在基因毒剂胁迫情况下, *PARG1* 的表达同样受到 *ATM* 与 *ATR* 基因的调控^[23], 但 *parg1* 突变株对于基因毒剂高度敏感, 其表型比 *atm* 及 *atr* 突变体更加严重, 推测 *PARG1* 蛋白可能以某种方式调控 DNA 损伤信号途径, 使得其表型比上游激酶突变后更加严重.

通过对 *parg1-4 atm-1* 双突变体的分析发现, 双突变体表型介于两种单突变体 *parg1-4* 和 *atm-1* 之间, 说明在 DNA 损伤响应这一途径中, 这两个基因不是简单的上下游关系. *ATM* 激酶可以调控 *PARG1* 基因的表达, *PARG1* 可能也能反作用于 *ATM*; 另外, 亦不能排除 *PARG1* 参与了 *ATM* 途径之外的 DNA 损伤信号途径.

在 *atm-1* 突变体中, 修复相关基因 *BRCA1* 和 *RAD51* 等无法被诱导, 细胞无法有效地响应 DNA 损伤而进行有效的修复; 而在 *parg1-4* 突变体中, 这两个基因的表达水平也有不同程度的下降, 说明 *PARG1* 尽管是 *ATM* 和 *ATR* 信号途径的下游基因, 但也可以影响 *ATM* 和 *ATR* 信号途径中 DNA 修复基因的表达, 但这种影响远低于 *ATM* 基因缺失所造成的影响. *parg1-4 atm-1* 双突变中, *BRCA1* 基因的表达水平比两个单突变中更低, 呈现出相加效应; 而 *RAD51* 的表达水平则高于 *atm-1* 突变体, 而低于 *parg1-4* 突变体, 说明 *PARG1* 与 *ATM* 介导的途径有相同之处但亦有差异, 在个体基因的调控上呈现出复杂性.

此外, 本课题组发现在 zeocin 处理条件下, *atm-1* 突变体尽管叶片变黄, 但根相比野生型和 *parg1-4* 都

长, 原因不明. *zeocin* 平板上 *parg1-4 atm-1* 双突变体的表型更接近 *atm-1* 单突变体, 表明双链断裂情况下 *ATM* 基因的缺失对双突变体影响更大; 在 *MMS* 条件下, 双突变体的表型则更接近于 *parg1-4* 突变体, 说明在单链断裂或者复制叉受阻 (replication fork stalling) 的情况下, *PARG1* 缺失对于植物生长的影响更大, *PARG1* 可能在 *ATM* 的上游起作用.

对于双突变体 *parg1atr-2* 的表型分析表明, 无论在 *zeocin* 还是 *MMS* 条件下, 双突变体的表型都与突变体 *parg1-4* 更加接近, 进一步支持了 *PARG1* 可能在 *ATR* 信号途径的上游发挥作用, 或者在不依赖于 *ATM* 和 *ATR* 的另一条未知途径中发挥了至关重要的作用.

已有研究发现, *PARG1* 基因与 *PARP1*, *PARP2* 的表达谱非常相近^[23], 其表达受 DNA 断裂剂的强烈诱导, 但在 *atm-1* 和 *atr-2* 突变体中这些基因的诱导水平都明显下调, 因此它们都被认为是 *ATM* 和 *ATR* 信号

途径的下游基因. 本课题组研究发现, *ATM*, *ATR* 与 *PARG1* 可能并非简单的上下游关系, *PARG1* 可能在 DNA 损伤响应途径的上游发挥一定的作用. 由于它的作用主要是降解 *PARP* 产生的 *PAR*, 使蛋白质恢复到原始状态, 因此推测 *PARP* 可能修饰了 DNA 损伤响应信号途径上游的一些关键蛋白, 由于 *PARG1* 的缺失, 使得 *PAR* 不能被及时去除, 从而影响了其上游蛋白质作用的发挥和进一步的信号过程. DNA 修复是一个高度协调的动态化过程, 涉及 DNA 复制、转录调节、细胞周期控制、细胞死亡等过程, 许多蛋白质在此过程相互配合, 功能发生动态变化, 因此 *PARG1* 缺失会造成严重的后果, 使得 DNA 修复过程受阻, 从而影响 DNA 复制、细胞周期进行, 导致细胞死亡过程被激活. 本文结果提示, 研究多聚 ADP 核糖化修饰对上游关键蛋白的调节作用是非常必要的, 目前在此方面还缺少证据, 有待未来进一步深入研究.

参考文献

- 1 Hoeijmakers J H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361: 1475–1485
- 2 Lord C J, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 2012, 481: 287–294
- 3 David S S, O'Shea V L, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 2007, 447: 941–950
- 4 Marteijn J A, Lans H, Vermeulen W, et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 465–481
- 5 Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5: a12740
- 6 Weterings E, van Gent D C. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis. *DNA Repair*, 2004, 3: 1425–1435
- 7 Lempiainen H, Halazonetis T D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*, 2009, 28: 3067–3073
- 8 Rupnik A, Lowndes N F, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 2010, 119: 115–135
- 9 Yoshiyama K, Sakaguchi K, Kimura S. DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals. *Biology*, 2013, 2: 1338–1356
- 10 Zou L, Elledge S J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 2003, 300: 1542–1548
- 11 Briggs A G, Bent A F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 372–380
- 12 Li M, Yu X. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in DNA damage response and cancer chemotherapy. *Oncogene*, 2015, 34: 3349–3356
- 13 Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, et al. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 517–528
- 14 Simbulan-Rosenthal C M, Rosenthal D S, Luo R, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*, 1999, 59: 2190–2194
- 15 Karras G I, Kustatscher G, Buhecha H R, et al. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J*, 2005, 24: 1911–1920
- 16 Elkholi R, Chipuk J E. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *BioEssays*, 2014, 36: 46–51
- 17 Kraus W L, Lis J T. PARP goes transcription. *Cell*, 2003, 113: 677–683
- 18 Krishnakumar R, Kraus W L. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell*, 2010, 39: 8–24
- 19 Davidovic L, Vodenicharov M, Affar E B, et al. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res*, 2001, 268: 7–13
- 20 Meyer-Ficca M L, Meyer R G, Coyle D L, et al. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants

- yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res*, 2004, 297: 521–532
- 21 Koh D W, Lawler A M, Poitras M F, et al. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17699–17704
 - 22 Feng B, Liu C, de Oliveira M V, et al. Protein poly(ADP-ribosyl)ation regulates arabidopsis immune gene expression and defense responses. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1004936
 - 23 Zhang H, Gu Z, Wu Q, et al. *Arabidopsis* PARG1 is the key factor promoting cell survival among the enzymes regulating post-translational poly(ADP-ribosyl)ation. *Sci Rep*, 2015, 5: 15892
 - 24 Li G, Nasar V, Yang Y, et al. *Arabidopsis* poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1 is required for drought, osmotic and oxidative stress responses. *Plant Sci*, 2011, 180: 283–291
 - 25 Garcia V. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell*, 2003, 15: 119–132
 - 26 Culligan K. ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2004, 16: 1091–104
 - 27 De Schutter K, Joubes J, Cools T, et al. *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell*, 2007, 19: 211–225
 - 28 Marr I L, Suryana N, Lukulay P, et al. Determination of chlorophyll a and b by simultaneous multi-component spectrophotometry. *Fresen J Anal Chem*, 1995, 352: 456–460
 - 29 Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, et al. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10004–10009
 - 30 Ray A, Langer M. Homologous recombination: ends as the means. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 435–440
 - 31 Boyko A. Double-strand break repair in plants is developmentally regulated. *Plant Physiol*, 2006, 141: 488–497
 - 32 Ceccaldi R, Rondinelli B, D Andrea A D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol*, 2016, 26: 52–64
 - 33 Culligan K M, Robertson C E, Foreman J, et al. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J*, 2006, 48: 947–961

Analysis of the Role of *Arabidopsis* Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase in ATM- and ATR-Dependent DNA Damage Response Signaling Pathways

YANG LiFeng, PAN WeiYang & GE XiaoChun

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

The DNA damage response signaling pathway plays an important role in maintaining genome integrity by detecting and repairing DNA damage arising from endogenous and exogenous stresses. A variety of proteins are involved in this pathway, including poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). PARG is an important enzyme that mediates the decomposition of poly(ADP-ribose) attached to proteins by poly(ADP-ribose) polymerase and thus regulates the activities of target proteins. PARG participates in the DNA damage response by mediating the poly(ADP-ribosyl)ation of relative proteins, but it is not known which proteins are affected. In this study, by constructing double mutants of *PARG1* and key DNA damage regulator genes *ATM* or *ATR*, followed by phenotypic and transcriptional level analyses of these mutants, we found that PARG1 may regulate the DNA damage response upstream of ATM and ATR kinases by regulating their modification status, providing a foundation for future studies.

poly(ADP-ribose) glycohydrolase, protein modification, DNA damage, signaling pathway

doi: 10.1360/N052016-00103