

DOI: 10.13376/j.cblls/2015160

文章编号: 1004-0374(2015)09-1160-08

*PURA*基因的结构与功能研究进展

李 薇, 郭志敏, 赵晓航*

(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘 要: 富含嘌呤元件结合蛋白 α (purine-rich element binding protein alpha, PUR α) 基因编码富含嘌呤的 DNA 和 RNA 结合蛋白。PUR α 在进化过程中高度保守。PUR α 蛋白既能直接或间接与 DNA 结合发挥转录因子的作用, 促进或抑制下游基因的转录, 也能通过与 mRNA 结合并影响其转运和翻译。PUR α 的结构变异与神经系统发育和 HIV 感染等多种疾病相关。近年发现 PUR α 的结构和功能变异也与肿瘤发生发展相关。PUR α 通过影响 DNA 损伤修复而影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。作为转录因子, PUR α 影响肿瘤相关基因的表达。PURA 基因突变和 PUR α 蛋白结构变异与肿瘤发生及肿瘤耐药性相关。

关键词: PUR α ; 转录因子; 肿瘤发生; RNA 结合蛋白

中图分类号: Q291; R730.231 **文献标志码:** A

Advances in the structure and function of *PURA* gene

LI Wei, GUO Zhi-Min, ZHAO Xiao-Hang*

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Purine-rich element binding protein alpha (PUR α) is a ubiquitous multifunctional protein that is strongly conserved throughout evolution. PUR α binds directly or indirectly to DNA and functions as transcription factor; in addition, PUR α binds to mRNA to influence its transport and translation. The structural variation of PUR α is involved in a variety of diseases including the nervous system development and HIV infection. Recently research found that the structural and functional variation of PUR α is related to the development of tumor. PUR α can affect cancer cell DNA damage repair system and influence the sensitivity to chemotherapy drugs. As a transcription factor, PUR α influence tumor associated gene expression. *PURA* gene mutation and variation of PUR α can affect tumorigenesis and tumor resistance to drugs.

Key words: PUR α ; transcription factor; tumorigenesis; RNA binding protein

转录因子 (transcription factor, TF) 是一种具有特殊结构、行使调控基因表达功能的蛋白质分子, 能与被调控基因 5' 端上游特定序列 (DNA motif) 专一性结合, 保证目的基因以一定强度在特定时间与空间表达。转录因子与 RNA 聚合酶 II 形成转录起始复合物, 共同参与转录起始过程。多数转录因子结合 DNA 前需要通过蛋白质 - 蛋白质相互作用形成二聚体或多聚体, 通过与所调控基因 5' 端上游特定序列 DNA 的直接结合, 或通过蛋白质 - 蛋白质的相互作用间接与该区域 DNA 结合而调控基因转录^[1]。PUR α (purine-rich element binding protein

alpha) 是 PUR 蛋白家族成员之一, 能结合单链或双链 DNA 或 RNA, 从而在 DNA 复制和转录与 RNA 翻译过程中发挥重要作用^[2]。PUR α 是个多效的转录因子, 可以与特定的 DNA 或 RNA 序列直接结合, 形成多聚体复合物, 或通过蛋白质 - 蛋白质相互作用

收稿日期: 2015-02-28; 修回日期: 2015-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81372591, 81321091); 国家高技术研究发展计划(“863”项目)(2012AA020206, 2014CBA02001, 2014BAI09B00)

*通信作者: E-mail: zhaoxh@cicams.ac.cn; Tel: 010-67709015

用与其他转录因子结合, 间接促进或抑制转录因子与特定基因启动子结合, 发挥转录激活或抑制作用。研究表明, 转录因子 $PUR\alpha$ 与包括脑肿瘤在内的多种肿瘤的发生发展密切相关^[3]。本文主要综述 *PURA* 基因的结构与功能, 以及 $PUR\alpha$ 的表达和变异与神经系统疾病和肿瘤的关系。

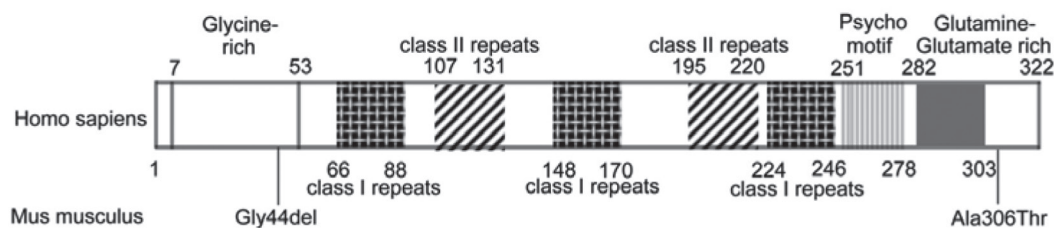
1 *PURA*基因的结构

PURA 基因编码富含嘌呤元件的 DNA 和 RNA 结合蛋白 $PUR\alpha$, 广泛存在于多种生物中, 在进化过程中高度保守。*PURA* 基因位于染色体 5q31, 长 11 640 bp。*PURA* 基因编码 322 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 34.911×10^3 , 主要定位于细胞核, 部分定位于细胞浆和线粒体^[4]。1990 年, 在 HeLa 细胞中发现了 *c-MYC* 基因上游 1.6 kb 富含嘌呤的 DNA 复制起始区结合蛋白 $PUR\alpha$ ^[5]; 后续研究也证实 $PUR\alpha$ 与富含嘌呤重复序列 (GGN)_n 的 DNA 或 RNA 单双链寡核苷酸具有高度亲和性, 可特异性地与某些基因启动子结合, 形成多聚体复合物; 还可以通过与其他转录因子结合而调控基因转录。研究发现, $PUR\alpha$ 可以与小鼠髓磷脂碱基因的启动子结合, 调节该基因的转录^[6]。

PURA 基因编码一个由 DNA 结合结构域、富含甘氨酸的 N 端结构域和富含谷氨酸-谷氨酰胺的 C 端结构域组成的蛋白 $PUR\alpha$ 。 $PUR\alpha$ 的 DNA 结合结构域包括 3 个重复的富含芳香族氨基酸残基的 class I 和 2 个重复的富含亮氨酸的 class II, 其中 class I 为碱性区域, class II 为酸性区域, 该结构域在进化中高度保守^[7]。三维晶体结构分析发现, PUR 蛋白的 DNA 结合结构域包括 3 个重复区域 (PUR repeat I、PUR repeat II、PUR repeat III), 每个 PUR repeat 结构包括 1 个 β 片层和 1 个称为旋转折叠的 α 螺旋, 其中 β 片层位于 PUR repeat 结构域表面, 负责与核酸结合。在旋转结构中, 其他的部

分参与蛋白质与蛋白质的相互作用。其中, PUR repeat I 和 PUR repeat II 形成了分子内蛋白质与蛋白质间的连接, PUR repeat III 可以与第二个 PUR 蛋白结合。 $PUR\alpha$ 蛋白 C 端和 PUR repeat III 的 α 螺旋对于 $PUR\alpha$ 与其他蛋白质间的相互作用具有重要作用^[3]。 $PUR\alpha$ 能特异性结合富含鸟嘌呤的核苷酸序列, 即特异性地与鸟嘌呤核苷酸碱基结合而不是与鸟嘌呤核苷酸的糖或磷酸盐结合。因此, $PUR\alpha$ 与 DNA 和 RNA 都能结合, 并扰乱 G 碱基的配对, 使局部 DNA 双链分离。*PURA* 基因在进化中高度保守。例如, 人类的 *PURA* 基因编码 322 个氨基酸^[4], 而小鼠的 *PURA* 基因编码 321 个氨基酸, 人与小鼠 $PUR\alpha$ 蛋白仅差两个氨基酸, 其中小鼠 $PUR\alpha$ 蛋白质序列与人的 $PUR\alpha$ 蛋白质序列相比, 缺失第 44 位甘氨酸; 人的 $PUR\alpha$ 蛋白第 306 位是丙氨酸, 而在小鼠中为苏氨酸 (图 1), 并且人与小鼠 $PUR\alpha$ 蛋白的三维结构一致^[8-9]。

$PUR\alpha$ 属 PUR 家族蛋白之一。 PUR 家族包含 $PUR\alpha$ 、 $PUR\beta$ 和两种不同亚型的 $PUR\gamma$ 蛋白, 其中 $PUR\alpha$ 编码基因位于染色体 5q31, $PUR\beta$ 编码基因位于 7p13, $PUR\gamma$ 编码基因位于 8p11, 它们都能结合 DNA 和 RNA^[10]。 PUR 家族蛋白具有共同结构特征, 其 DNA 结合结构域都包含三个重复区域和富含甘氨酸 (G) 的 N 端结构域。 $PUR\alpha$ N 端结构域的 58 个氨基酸中 50% 为甘氨酸。 $PUR\gamma$ N 端结构域 57 个氨基酸中仅有 13 个为甘氨酸。 $PUR\alpha$ 的 C 端有一个谷氨酰胺残基 (Q) 和一个富含谷氨酸 (E)-天冬氨酸 (D) 的结构域。 $PUR\beta$ 的 C 端缺乏 Q 残基, 但是 N 端包括 E-D 结构域。 $PUR\gamma$ 缺乏 Q 残基和富含 E-D 的结构域^[3]。而 Q 残基和富含 E-D 的结构域对于 $PUR\alpha$ 与其他蛋白的结合非常重要, 所以本文选择 $PUR\alpha$ 作为对象, 讨论 $PUR\alpha$ 与 DNA 复制与损伤修复、转录、信使核糖核蛋白 (messenger ribonucleoprotein, mRNP) 转运和翻译的关系。



7~53aa: N端; 53~282aa: DNA结合区域; 282~322aa: C端; 小鼠中缺失第44位甘氨酸, 306位是为苏氨酸。

图1 $PUR\alpha$ 蛋白质结构(参考^[7])

2 PURA基因的功能

2.1 与启动子区DNA序列结合参与转录调控

PURA 基因编码一个可与 DNA 和 RNA 结合的多功能蛋白质 PUR α , 参与 DNA 复制起始、转录调控和 mRNA 翻译。在执行 DNA 复制起始和转录调控功能时, PUR α 首先打开 DNA 双链结构, 然后结合到靶区域的单链 DNA 上。PUR α 既能与线性 DNA 结合, 也能与超螺旋 DNA 结合; 而 PUR α 蛋白 C 端对维持线性 DNA 的稳定性非常重要。

作为转录激活因子, PUR α 与特异性的单链 DNA 结合, 影响 DNA 复制起始, 促进特定基因转录^[11], 如促进编码 TNF- α 、髓鞘碱性蛋白质、 β -整合素、胎盘催乳激素、TGF β -1、神经元特异性 FE65 蛋白和 PDGF-A 蛋白等基因的转录。在人乳腺癌 ERBB2 阳性细胞中, 通过启动子区域特异结合蛋白质捕获与质谱分析, 鉴定了该区域 PUR α 、Ku70、Ku80、核仁素以及 hnRNP K 等结合蛋白, 这些蛋白质在启动子区域形成一个多聚体, 促进 ERBB2 在乳腺癌中过表达, 并且在人乳腺癌 MCF-7 和乳腺导管瘤 BT-474 细胞中得到进一步验证^[12]。同样, PUR α 也可以与胰岛素基因启动子区域富含嘌呤的特定序列结合而促进胰岛素表达^[13]。PUR α 不仅促进基因的转录, 也参与 DNA 的复制, PUR α 可以与鼠醛缩酶 B 启动子区域的多聚嘌呤片段结合, 参与醛缩酶基因的复制。在一个长 DNA 片段的双螺旋结构中, 多聚嘌呤片段是不稳定的, 而 PUR α 可以维持多聚嘌呤片段单链的稳定性。如果将多聚嘌呤片段从 DNA 复制的起始部位敲除, 就可以降低 DNA 的复制活性。免疫沉淀也显示, 多聚嘌呤片段缺失后不能检测到 PUR α 与 DNA 的结合, 这就说明多聚嘌呤片段和 PUR α 对于醛缩酶基因复制起始有重要作用^[14]。

PUR α 蛋白也可以作为转录抑制因子, 负向调控特定基因的转录, 如 PUR α 参与 α -actin、淀粉样蛋白前体 (amyloid- β protein precursor, A β PP)、CD43、 α -肌球蛋白、fas 和生长抑制素等基因的负向调控。通过染色质免疫共沉淀分析发现, PUR α 直接与淀粉样蛋白前体基因的启动子结合, 降低启动子的活性, 从而负向调节该基因的转录; 然而, PUR α 不仅仅通过一种机制调节 A β PP 的表达, PUR α 可以直接下调转录因子 E2F-1, 也可以与 E2F-1 的伴侣分子 Rb 相互作用, 竞争性地抑制 E2F-1 对 A β PP 启动子的正向调节^[15]; PUR α 和 PUR β 与 α -肌球蛋

白基因第一内含子区域内富含嘌呤的负调控 (purine-rich negative regulatory, PNR) 元件的正义链结合, 在基因上游调节序列存在条件下抑制报告基因的活性, 但是不能改变 α -肌球蛋白基因启动子的活性^[16]。在慢性粒细胞白血病 K562 细胞活化的过程中, 不均一核糖核蛋白 K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP-K) 与 PUR α 蛋白共同结合到 CD43 基因的启动子上, 其中, PUR α 在启动子上的结合区域位于 hnRNP-K 结合区域的上游, 两者协同抑制 CD43 基因的转录^[17]。

2.2 与转录因子相互作用参与转录调控

PUR α 蛋白是个多效的转录因子, 可以直接与识别的 DNA 或 RNA 序列结合, 形成多聚体复合物, 调控靶基因的表达, 也可以通过蛋白质-蛋白质相互作用与其他转录因子结合, 间接促进或抑制转录因子与特定基因的启动子结合, 发挥转录激活或转录抑制的作用。例如, PUR α 蛋白可以与 RB、E2F1、Sp1、YB1、cyclin T1/Cdk 9 和 cyclin A/Cdk 2 等调节蛋白结合而发挥转录调控作用^[18-20]。研究发现, 组蛋白 H1 可以和许多调节因子结合, 负向调节特异基因的表达。通过构建表达 H1.2 (H1 的亚型) 的细胞系, 用来纯化与 H1 相互作用的蛋白质。结果显示, H1.2 可以稳定地与辅助因子和核糖体蛋白结合形成复合物, 从而显著抑制 p300 介导的基因转录。H1.2 复合物中除了包括 H1.2 和 p53 的直接相互作用, 还存在 YB1 和 PUR α 两个转录因子的间接相互作用; H1.2 复合物对基因表达的抑制作用反过来还会抑制 p300 介导的基因的乙酰化。另外, 染色体共沉淀和 RNA 相互作用分析进一步证实, PUR α 可以与 YB-1 转录因子和组蛋白 H1.2 相互作用, 共同抑制 BAX 基因的转录^[21]。

在人肺成纤维细胞中, PUR α/β 和 YB-1 转录抑制因子相互作用, 参与调节血清反应因子 (serum response factor, SRF) 与 DNA 结合的活性, 以及磷酸化 Smad 3 (p-Smad3) 转录激活子与 DNA 结合的活性。在非增殖状态的纤维细胞中, PUR α 可增强活化前 SRF 与 SM α A 基因核心启动子结合的稳定性, 而 PUR β 发挥相反的作用, 可以破坏 SRF-DNA 的相互作用。在成纤维细胞分化的早期, 通过形成不稳定的 p-Smad3/MRTF-A (myocardin-related transcription factor-A)/PUR β 复合物, 促进 PUR α 与 SRF 复合物的解离, 降低了 SM α A 基因的转录; 而在成熟的成纤维细胞中, p-Smad3/MRTF-A/PUR β 复合物中的 PUR β 被 PUR α 取代, 促进 SM α A 的转

录。然后, $PUR\alpha$ 和 YB-1 共同发挥分子伴侣的作用, 促进 $SM\alpha A$ 的 mRNA 出核^[22]。

2.3 与RNA结合调控mRNA转运和翻译

$PUR\alpha$ 蛋白可以通过与特定基因的 mRNA 直接结合, 参与该基因 mRNA 的出核转运, 也可以通过与其他转录因子结合而调节 mRNA 的翻译。 $PUR\alpha$ 作为一种中间分子, 募集多种与 mRNA 转运和翻译相关的蛋白质, 参与 mRNA 的转运和翻译。例如, 染色体 9 开放阅读框 10 蛋白质 (chromosome 9 open reading frame 10, C9orf10) 包含 RNA 结合结构域。C9orf10 在胚胎期表达, 而 $PUR\alpha$ 在小鼠出生 5 d 后表达; 在成年小鼠中, C9orf10 在大脑海马区、大脑皮层和小脑中表达, 而 $PUR\alpha$ 表达受到抑制; C9orf10 阳性的细胞免疫反应 $PUR\alpha$ 也为阳性。这些结果说明, C9orf10 和 $PUR\alpha$ 在脑组织存在相互作用, 影响与脑发育相关基因的 mRNA 转运和翻译^[23]。在神经元细胞中, $PUR\alpha$ 参与 RNA 的出核和胞浆信使核糖核蛋白质 (messenger ribonucleoprotein, mRNP) 复合物在胞浆中的转运。在神经元树突中, 脆性 X 智力低下蛋白 (fragile X mental retardation protein, FMRP) 通过与 $PUR\alpha$ 相互作用而调节 mRNA 转运和翻译^[3,25]。果蝇中 $PUR\alpha$ 功能检测发现, 在卵子发生过程中, 早期卵母细胞中有蛋白质的积累, 纯化的蛋白质中 mRNP 复合物中鉴定到了 $PUR\alpha$ 蛋白的存在, 所以在果蝇卵母细胞中 $PUR\alpha$ 可以调控 mRNP 的出核及其在胞浆中的转运^[24]。

3 $PUR\alpha$ 结构变异与疾病

PUR 家族蛋白的缺失、突变和畸变与人类疾病密切相关。 PUR 家族蛋白在骨髓来源的细胞发育、肌肉发育和脑发育, 以及将 mRNA 运输至神经元树突等的过程中发挥重要作用。迄今, 发现 PUR 家族蛋白结构和功能异常与包括早衰、X 染色体脆性综合征、智力障碍以及肿瘤等疾病密切相关。

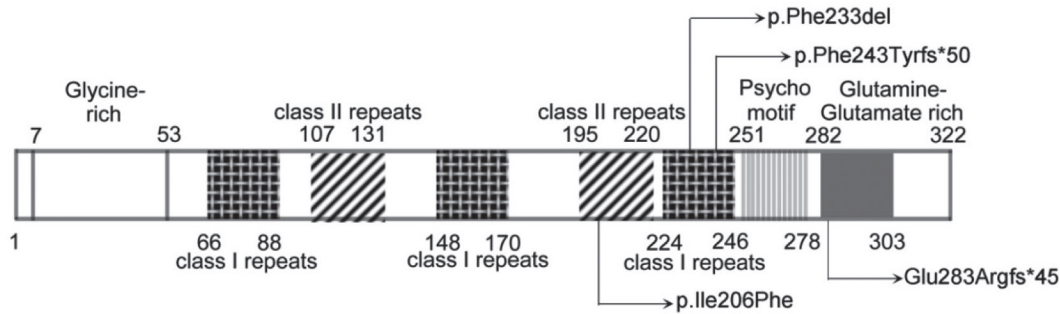
3.1 $PUR\alpha$ 与神经系统发育和疾病

PURA 基因变异与中枢神经系统发育异常和退化性病变相关。研究表明, $PUR\alpha$ 对基因组稳定性和特定器官的基因表达 (如免疫系统或中枢神经系统特定细胞) 具有重要的作用。中枢神经系统的神经元和胶质细胞只有树突部位离细胞核较远的地方才能对外界信号做出快速反应。因此, 这些细胞中存在一套有效的 mRNA 运输和翻译系统, 能在远离细胞核的特定位置进行蛋白质的翻译, 而 $PUR\alpha$

在这一转运系统中发挥着重要作用。脆性 X 智障基因 (fragile X mental retardation gene, *FMR1*) 是导致 X 染色体脆性综合征的主要致病基因, 能引起染色体不稳定和编码蛋白的缺失。*FMR1* 的编码蛋白 FMRP 作为一个 RNA 结合蛋白在神经元中同样与 mRNA 转运相关。在神经元细胞内存在 mRNA- $PUR\alpha$ 和 FMRP 相互作用以及 mRNA 转运相关的非编码 RNA。小鼠中 $PUR\alpha$ 能与脑基质 RNA (brain cytoplasmic RNA, BC1 RNA) 结合, BC1 RNA 为非编码 mRNA, 参与神经元树突 mRNA 的转运^[26]; 人类 $PUR\alpha$ 能与小鼠 BC1 RNA 的同源物 BC200 RNA 结合。BC1 和 BC200 均参与神经元突触中 mRNA 的靶向翻译过程。尽管 FMRP 和 BC1 均涉及 mRNA 的特定位点翻译, 但研究发现 FMRP 与它的靶 mRNA 之间的相互作用不依赖 BC1 的存在, 说明两者在翻译过程中是单独发挥作用的。由于 $PUR\alpha$ 与 FMRP 和 BC1 mRNA 均会发生作用, 所以, $PUR\alpha$ 可能会与不同的因子结合而调节不同的 mRNA 翻译, 在神经元树突中 FMRP 通过与 $PUR\alpha$ 相互作用而发挥调节 mRNA 转运和翻译的功能, 影响神经元和胶质细胞对外界刺激的反应^[3,25]。

常见神经系统遗传病, 如额颞叶退化和肌萎缩侧索硬化症等, 含有 9 号染色体开放阅读框 G_4C_2 核苷酸六聚体重复性扩增, 在 RNA 降解过程中形成 RNA 聚集体 (RNA foci)。RNA 聚集体可募集 RNA 结合蛋白, 其中包括 $PUR\alpha$ 等的 RNA 结合蛋白和不均一核糖核蛋白 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNPs) 相互作用, RNA 结合蛋白和 hnRNPs 对 RNA 聚集体的隔离可影响 RNA 的加工, 产生细胞毒性, 并改变目的基因的表达^[27]。

对 4 例严重神经发育迟缓和/或学习障碍家系中同一家庭的三代个体 (family trios) 遗传物质开展了全外显子测序分析, 发现了 *PURA* 基因新的突变 (*de novo* mutation) 位点, 该突变是导致严重神经发育迟缓和/或学习障碍的因素之一。在 4 个患病个体中, 发现影响 $PUR\alpha$ 蛋白表达的突变包括两种不同的移码突变——缺失突变和错义突变 (图 2)。模式动物研究提示, $PUR\alpha$ 是一种高度保守的在脑发育中具有重要功能的蛋白质。*PURA* 基因的 *de novo* 杂合子突变在人类中的表型尚未确定, 但与中度和严重的神经系统发育迟缓和/或学习能力缺陷有关。*PURA* 基因与神经系统发育迟缓和/或学习障碍等疾病之间直接的关系, 提示一种基因型和表型间的相关性; 另外, 扰乱 $PUR\alpha$ 蛋白中的 PUR repeat III 结构域可



箭头代表患病个体中，PUR α 蛋白表达的突变位点。

图2 PUR的突变位点(参考^[28])

能导致更严重的表型改变^[28]。

无PUR α 蛋白活性的转基因小鼠，出生后大脑发育受抑制。PUR $\alpha^{-/-}$ 小鼠出生时正常，但2周后出现神经系统紊乱，4周后小鼠死亡。PUR $\alpha^{-/-}$ 小鼠的大脑皮层、海马区和小脑部位的细胞很少，前体细胞增殖减少。PUR $\alpha^{+/+}$ 小鼠，在出生5 d小脑发育重要阶段，PUR α 和Cdk 5在体细胞和浦肯野细胞树突部位表达水平很高；而在PUR $\alpha^{-/-}$ 小鼠中，PUR α 和Cdk 5在体细胞和浦肯野细胞树突中部表达。因此，PUR α 参与出生后小鼠大脑发育，在脑发育中具有重要功能^[29]。

3.2 PUR α 与肿瘤

PUR α 基因位于5q31，染色体5q31区域的基因包括几种白介素和早期生长反应基因-1 (early growth response protein 1, *EGR-1*)，可以编码多种细胞因子；PUR α 基因距离*EGR-1*基因大约1 Mb。荧光原位杂交技术分析发现，骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 中PUR α 与*EGR-1*发生多种形式的易位，而MDS具有很高的频率进展为急性髓细胞性白血病 (acute myelocytic leukemia, AML)。当一条5号染色体长臂发生缺失时，如果没有另外的遗传变异，发生MDS并导致AML的几率很低；而5q31缺失联合5q31的其他变异或其他位点的PUR α 基因突变，如PUR β ，则发生MDS并导致AML的几率显著增加^[30]。在原始神经外胚瘤、松果体母细胞瘤和颅内室管膜瘤等神经系统肿瘤中也伴有5q31染色体修饰改变^[3,25]。

PUR α 蛋白是核基质的成分，与雄激素依赖的前列腺癌细胞相比，PUR α 在非雄激素依赖的前列腺癌细胞中表达降低，并且在非雄激素依赖的前列腺细胞中过表达PUR α 可以抑制细胞的增殖^[31]。在非雄激素依赖的前列腺细胞中过表达PUR α 可以诱导应激反应通路相关基因的表达和细胞分化相关基

因的表达，并且这些基因受雄激素调节。因而，PUR α 也参与雄激素受体调节通路。雄激素受体 (AR) 的表达在前列腺癌 (PC) 中有重要的作用。在癌症和转移性疾病中AR表达增加，当PUR α 表达或者活化后可以降低AR的转录水平；并且，过表达PUR α 的非雄激素依赖的前列腺癌细胞PC3注射小鼠后，触诊没有明显的肿瘤，而表达空载的PC3细胞注射小鼠7周后可以检测到明显的肿瘤生长。所以，PUR α 在非雄激素依赖的前列腺癌中具有抑制肿瘤的作用。因此，调节PUR α 的表达可以作为治疗非雄激素依赖的前列腺癌的靶点^[32]。

PUR α 蛋白在不同的肿瘤中具有不同的作用。顺铂通过与DNA相互作用而引起DNA的交联，引发细胞周期检查点信号通路激活，最终导致细胞凋亡。大多数肿瘤对顺铂是敏感的，然而在治疗过程中由于突变或表观遗传修饰的原因会导致最初对顺铂敏感的细胞产生对顺铂的耐药性；另外，由于PUR α 参与DNA复制叉位置双链DNA损伤修复和细胞内对DNA复制压力的反应，及DNA同源重组修复，也会导致细胞产生对顺铂的耐药性。

缺失PUR α 蛋白的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryo fibroblast, MEFs) 经顺铂处理后，DNA双链断裂标志分子磷酸化组蛋白2A变异体 (histone family 2A variant, H2AX) 增加。在缺失PUR α 蛋白和存在PUR α 蛋白的MEFs细胞中，转染一个对顺铂敏感的报告质粒，比较经过顺铂处理后两种细胞中质粒活性的恢复能力，发现PUR α 缺失后质粒活性降低，同时该细胞非同源末端连接修复的能力受损^[33]。在人胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、前列腺癌和宫颈癌细胞中的研究发现，用siRNA抑制PUR α 的表达，检测顺铂处理后细胞存活和集落形成，发现这两种细胞对顺铂的敏感性增加，提示PUR α 可能是通过与DNA结合，保护DNA免受这些具有

遗传毒性的化学试剂的影响。另外, *PUR*α在非同源末端连接修复系统中发挥重要的作用, 提示*PUR*α也可以在DNA损伤后募集DNA损伤修复蛋白, 参与DNA的损伤修复。不同细胞中, *PUR*α敲降所引起的顺铂敏感性增加的程度不同。一些对顺铂耐药的细胞, 采用siRNA敲降*PUR*α后对顺铂的敏感性显著增加; 而顺铂敏感的细胞, 敲降*PUR*α对顺铂的敏感性影响不大。这有可能为治疗对顺铂耐药的肿瘤提供一种新的方案^[33]。

卵巢癌是一种恶性疾病, 在疾病病因学中卵巢上皮具有重要作用。为了鉴定在卵巢癌发生过程中一些基因的变化, 使用6种小鼠卵巢上皮(mouse ovarian surface epithelial, MOSE)细胞系和人卵巢癌体外模型进行全基因的转录分析, 结果发现20个表达上调的基因中有10个基因参与卵巢的形成。有20%异常表达的基因与细胞外的成分有关; 同时还鉴定到*PURA*基因与细胞内肿瘤的形成有关, 这为卵巢癌诊断和靶向治疗提供了新的资源^[34]。

3.3 *PUR*α变异与其他疾病

单核细胞中某些microRNA可以抑制*PURA*基因mRNA的翻译, 使单核细胞不易被HIV-1感染。研究发现,*PUR*α蛋白参与人免疫缺陷病毒1(HIV-1)复制调节, 通过与病毒TAR RNA结合而增强病毒基因的转录。靶向*PURA*基因的miRNA调控依赖于分化的单核细胞/树突状细胞(dendritic cells, DCs)对HIV-1感染的敏感性。在单核细胞中, 感染该miRNA抑制剂, 促使*PURA*基因表达, 进而促进了HIV-1感染, 提示宿主抑制*PURA*基因表达的microRNA有助于单核细胞抵抗HIV-1的感染^[35]。

杆状病毒VP1054蛋白和细胞中与富含嘌呤的核苷酸结合蛋白*PUR*α具有相似的序列和功能。研究显示, 基因可以从宿主转移到杆状病毒。多核病毒*vp1054*基因的缺失可以阻止病毒从细胞到细胞的传递。VP1054蛋白是病毒DNA核衣壳合成所必需的。在病毒基因组中遗传元件包括重复的GGN三聚体基序, GGN三聚体基序是*PUR*α蛋白结合的靶序列。富含GGN的序列不均匀地分布在病毒基因组中, VP1054可以识别GGN序列。一些病毒, 如HIV-1和人JC病毒(JCV)利用宿主*PUR*α蛋白, 而杆状病毒可以编码*PUR*α样蛋白VP1054, VP1054对于病毒的复制非常重要^[36]。

*PUR*α也是一种RNA结合蛋白, 但其作为RNA结合蛋白如何在疾病中发挥作用并没有明确的报道。目前已有成熟的方法用于研究RNA结合

蛋白与疾病的关系。例如, 在肌肉分化过程中, 线粒体DNA(mtDNA)编码蛋白质表达水平升高, 而mtDNA拷贝数或转录本并无显著上升。通过紫外交联免疫沉淀和交联免疫共沉淀测序技术(CLIP-seq)分析发现, 在成肌细胞C2C12分化中, microRNA(miR-1)和Ago2相互作用增强线粒体蛋白质的翻译^[37]。多能干细胞或者一种细胞逆分化成另外一种类型的细胞过程中需要特异性的转录因子调节。抑制单一的一个在正常脑发育过程中通过miR-124发挥作用的RNA结合蛋白质——多嘧啶序列结合蛋白(polypyrimidine-tract-binding, PTB), 能够有效地诱导成纤维细胞逆分化为功能性神经元。在神经元发育过程中多个关键基因, 如PolII Ser5磷酸酶基因(Pol II Ser5 phosphatase, *SCPI*)的3'UTR区域存在PTB和miR-124靶向位点的直接竞争结合作用, 从而影响mRNA的翻译, 导致成纤维细胞直接转化为神经元细胞^[38]。在人类基因组中, 转运因子(transposable elements, TEs)可以显著影响转录调控网络的发展。通过CLIP-Seq实验将RNA结合蛋白定位到RNA位点中, 可以用于研究TEs在mRNA和长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)转录后修饰过程中的作用^[39]。总之, *PUR*α也是一种RNA结合蛋白, 其与疾病关系的研究可以采用以上方法。

4 展望

*PUR*α作为一种单链核苷酸结合蛋白, 除了结合单链DNA外也能与单链RNA结合, 参与特定mRNA的出核转运与翻译, 并通过与不同转录因子结合调控多种基因的表达。*PUR*α参与包括神经系统发育、肿瘤发生发展与耐药等多种生物学进程, 研究DNA/RNA结合蛋白*PUR*α作用的分子机理, 特别是发现与*PUR*α功能蛋白结合的特定RNA及其基序, 对认识*PUR*α调控基因及其信号通路具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Liu L, White MJ, MacRae TH. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *Eur J Biochem*, 1999, 262: 247-57
- [2] Johnson EM. The Pur protein family: clues to function from recent studies on cancer and AIDS. *Anticancer Res*, 2003, 23: 2093-100
- [3] Johnson EM, Daniel DC, Gordon J. The pur protein family: genetic and structural features in development and disease. *J Cell Physiol*, 2013, 228: 930-7

- [4] Ma ZW, Pejovic T, Najfeld V, et al. Localization of PURA, the gene encoding the sequence-specific single-stranded-DNA-binding protein Pur α , to chromosome band 5q31. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 71: 64-7
- [5] Vassilev L, Johnson EM. An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the *c-myc* gene in proliferating HeLa cells. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 4899-904
- [6] Haas S, Gordon J, Khalili K. A developmentally regulated DNA-binding protein from mouse brain stimulates myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 3103-12
- [7] Darbinian N, Gallia GL, King J, et al. Growth inhibition of glioblastoma cells by human PUR α . *J Cell Physiol*, 2001, 189: 334-40
- [8] Muralidharan V, Cort L, Meier E, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of mouse *Pura* gene. *J Cell Biochem*, 2000, 77: 1-5
- [9] Ma ZW, Bergemann AD, Johnson EM. Conservation in human and mouse *Pura* of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication. *Gene*, 1994, 149: 311-4
- [10] Wortman MJ, Johnson EM, Bergemann AD. Mechanism of DNA binding and localized strand separation by *Pura* and comparison with Pur family member, Pur β . *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1743: 64-78
- [11] Bae CH, Kim DS, Jun YL, et al. Proteomic analysis of the effect of acupuncture on the suppression of kainic acid-induced neuronal destruction in mouse hippocampus. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 436315
- [12] Zhang T, Zhang H, Wang Y, et al. Capture and identification of proteins that bind to a GGA-rich sequence from the *ERBB2* gene promoter region. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404: 1867-76
- [13] Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat Genet*, 1995, 9: 293-8
- [14] Shimotai Y, Minami H, Saitoh Y, et al. A binding site for Pur α and Pur β is structurally unstable and is required for replication *in vivo* from the rat aldolase B origin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 517-25
- [15] Darbinian N, Cui J, Basile A, et al. Negative regulation of A β PP gene expression by Pur- α . *J Alzheimers Dis*, 2008, 15: 71-82
- [16] Gupta M, Sueblinvong V, Raman J, et al. Single-stranded DNA-binding proteins PUR α and PUR β bind to a purine-rich negative regulatory element of the α -myosin heavy chain gene and control transcriptional and translational regulation of the gene expression. Implications in the repression of α myosin heavy chain during heart failure. *J Biol Chem*, 2003, 278: 44935-48
- [17] Da Silva N, Bharti A, Shelley CS. hnRNP-K and Pur α act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood*, 2002, 100: 3536-44
- [18] Itoh H, Wortman MJ, Kanovsky M, et al. Alterations in Pur α levels and intracellular localization in the CV-1 cell cycle. *Cell Growth Differ*, 1998, 9: 651-65
- [19] Johnson EM, Chen PL, Krachmarov CP, et al. Association of human Pur α with the retinoblastoma protein, Rb, regulates binding to the single-stranded DNA Pur α recognition element. *J Biol Chem*, 1995, 270: 24352-60
- [20] Stacey DW, Hitomi M, Kanovsky M, et al. Cell cycle arrest and morphological alterations following microinjection of NIH3T3 cells with Pur α . *Oncogene*, 1999, 18: 4254-61
- [21] Kim K, Choi J, Heo K, et al. Isolation and characterization of a novel H1.2 complex that acts as a repressor of p53-mediated transcription. *J Biol Chem*, 2008, 283: 9113-26
- [22] Hariharan S, Kelm RJ Jr, Strauch AR. The Pur α /Pur β single-strand DNA-binding proteins attenuate smooth-muscle actin gene transactivation in myofibroblasts. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1256-71
- [23] Kobayashi Y, Suzuki K, Kobayashi H, et al. C9orf10 protein, a novel protein component of Pur α -containing mRNA-protein particles (Pur α -mRNPs): characterization of developmental and regional expressions in the mouse brain. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56: 723-31
- [24] Aumiller V, Graebisch A, Kremmer E, et al. *Drosophila* Pur- α binds to trinucleotide-repeat containing cellular RNAs and translocates to the early oocyte. *RNA Biol*, 2012, 9: 633-43
- [25] Johnson EM, Kinoshita Y, Weinreb DB, et al. Role of Pur α in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J Neurosci Res*, 2006, 83: 929-43
- [26] Skryabin BV, Sukonina V, Jordan U, et al. Neuronal untranslated BC1 RNA: targeted gene elimination in mice. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 6435-41
- [27] Stepto A, Gallo JM, Shaw CE, et al. Modelling C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, 2014, 127: 377-89
- [28] Hunt D, Leventer RJ, Simons C, et al. Whole exome sequencing in family trios reveals *de novo* mutations in PURA as a cause of severe neurodevelopmental delay and learning disability. *J Med Genet*, 2014, 51: 806-13
- [29] White MK, Johnson EM, Khalili K. Multiple roles for Pur α in cellular and viral regulation. *Cell Cycle*, 2009, 8: 1-7
- [30] Lezon-Geyda K, Najfeld V, Johnson EM. Deletions of PURA, at 5q31, and PURB, at 7p13, in myelodysplastic syndrome and progression to acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 2001, 15: 954-62
- [31] Inoue T, Leman ES, Yeater DB, et al. The potential role of purine-rich element binding protein (PUR) α as a novel treatment target for hormone-refractory prostate cancer. *Prostate*, 2008, 68: 1048-56
- [32] Inoue T, Maeno A, Talbot C Jr, et al. Purine-rich element binding protein (PUR) α induces endoplasmic reticulum stress response, and cell differentiation pathways in prostate cancer cells. *Prostate*, 2009, 69: 861-73
- [33] Kaminski R, Darbinyan A, Merabova N, et al. Protective role of Pur α to cisplatin. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 1926-35
- [34] Urzúa U, Roby KF, Gangi LM, et al. Transcriptomic analysis of an *in vitro* murine model of ovarian carcinoma:

- functional similarity to the human disease and identification of prospective tumoral markers and targets. *J Cell Physiol*, 2006, 206: 594-602
- [35] Shen CJ, Jia YH, Tian RR, et al. Translation of Pur- α is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB J*, 2012, 26: 4755-64
- [36] Marek M, Romier C, Galibert L, et al. Baculovirus VP1054 is an acquired cellular PUR α , a nucleic acid-binding protein specific for GGN repeats. *J Virol*, 2013, 87: 8465-80
- [37] Zhang X, Zuo X, Yang B, et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*, 2014, 158: 607-19
- [38] Xue Y, Ouyang K, Huang J, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*, 2013, 152: 82-96
- [39] Kelley DR, Hendrickson DG, Tenen D, et al. Transposable elements modulate human RNA abundance and splicing via specific RNA-protein interactions. *Genome Biol*, 2014, 15: 537