



评述

细菌ADP-核糖基转移酶的结构基础及研究进展

吴欢¹, 欧阳松应^{1,2}, 关洪鑫^{1*}

1. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350117;

2. 福建师范大学南方生物医学研究中心, 福州 350117

* 联系人, E-mail: guanhongxin@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2023-07-24; 接受日期: 2023-09-12; 网络版发表日期: 2024-01-05

国家自然科学基金(批准号: 82225028, 82172287, 31900879, 32171265)和国家重点研发计划(批准号: 2021YFC2301403)资助

摘要 ADP核糖基化(ADP-ribosylation)是一种广泛存在于生物体内的蛋白质翻译后修饰, 它由腺苷二磷酸核糖基转移酶(adenosine diphosphate ribosyltransferases, ARTs)催化完成. 细菌ARTs通过将ADP-核糖从NAD⁺转移到特定底物, 进而调控宿主细胞的不同生命过程, 最终帮助其繁殖并感染. 随着研究的不断深入, 发现除了经典的ARTs, 细菌毒素-抗毒素系统或效应蛋白也可以发挥ARTs作用, 并且识别的底物非常广泛, 参与调控的生命过程也更加多样. 本文总结了经典的ARTs和具有ADP-核糖基化修饰功能的毒素/抗毒素或效应蛋白, 从其结构特点、靶向底物和残基的特异性以及机制进行综述, 有助于深入理解细菌ADP-核糖基化修饰的机制, 并为进一步阐明重要致病菌基于ADP-核糖基化修饰系统的致病机理提供帮助, 也可为寻找新的治疗靶点提供参考.

关键词 ADP-核糖基转移酶, 分类, 结构, 底物, 靶向残基

翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)系统广泛存在于病毒、细菌和真核生物中, 它通过改变蛋白质的定位、活性、稳定性和蛋白质之间的相互作用等方式, 对蛋白质的功能进行调控, 并增加蛋白质组的多样性^[1,2]. 它既是蛋白质结构完整与功能成熟过程的重要组成部分, 也参与转录调控、信号转导等多种细胞过程^[3]. 常见的PTMs包括糖基化(glycosylation)、磷酸化(phosphorylation)、泛素化(ubiquitination)、甲基化(methylation)、乙酰化(acetylation)和ADP-核糖基化等^[1,4]. 其中ADP-核糖基化修饰系统是最早发现的PTMs之一, 它可能起源于细菌, 在种间和种内竞争、胁迫反应和致病性中发挥重要作用^[5]. 有

趣的是, 在进化过程中, 真核生物也逐渐获得了这种翻译后修饰系统, 并利用该修饰系统参与抵御病原菌的免疫反应, 相当于利用病原菌的武器来进行反击^[6,7]. 由于病原菌与宿主免疫系统之间的这种选择压力, ADP-核糖基化已经成为细菌应对宿主免疫系统的重要工具, 并不断发生进化, 帮助其增殖和感染.

在细菌中, ADP-核糖基转移酶(adenosine diphosphate ribosyltransferases, ARTs)最初作为毒力因子被发现, 又称为细菌ADP-核糖基转移酶毒素(bacterial ADP-ribosyltransferase toxins, bARTTs). bARTTs在细菌中分布广泛, 包括一些人类病原菌, 如白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cho-*

引用格式: 吴欢, 欧阳松应, 关洪鑫. 细菌ADP-核糖基转移酶的结构基础及研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 831–844

Wu H, Ouyang S Y, Guan H X. Structural basis and research progress of bacterial ADP-ribosyltransferase (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 831–844, doi: [10.1360/SSV-2023-0082](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0082)

lera)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)和化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*); 植物病原体如丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)和昆虫病原体如发光细菌(*Photobacterium luminescens*)等^[8]。bARTTs能够高度特异性地修饰宿主靶标蛋白的特定氨基酸残基, 来调节宿主蛋白的活性, 进而扰乱其正常生理功能。随着近年来对细菌ARTs的研究逐渐深入, 发现一些重要致病细菌的效应蛋白或细菌毒素/抗毒素也可以通过其ADP-核糖基转移酶活性修饰宿主细胞、细菌本身或其竞争细菌的一些重要蛋白、核酸甚至小分子^[9-12], 从而调控不同的生命过程, 最终帮助自身的生存和繁殖。

本文主要对bARTTs和新发现的具有ADP-核糖基化修饰功能的效应蛋白或细菌毒素/抗毒素的结构特点、靶向的底物及其关键氨基酸残基的特异性和机制进行综述, 有助于人们后续深入理解细菌ADP-核糖基化修饰的机制, 并为进一步阐明重要致病细菌基于ADP-核糖基化修饰的致病机理提供帮助, 也可为寻找新的治疗靶点提供参考。

1 ADP-核糖基化修饰概述

ADP-核糖基化是一个动态可逆的修饰系统, 细菌中参与ADP-核糖基化修饰的酶主要包括ADP-核糖基转移酶和ADP-核糖基水解酶。ARTs能将NAD⁺水解成ADP-核糖(ADP-ribose, ADPr)和烟酰胺(nicotinamide, NAM), 并将ADPr转移到底物分子带有亲核氧、氮或硫的核酸或氨基酸侧链上, 与核糖之间形成O-糖苷键、N-糖苷键或S-糖苷键^[5]。而ARHs负责将底物上的ADPr切除。ARTs修饰的底物具有多样性, 底物除了蛋白质(图1A), 还可以是核酸(包括DNA和RNA)(图1B和C)、小分子抗生素(如利福平)等(图1D)。

当被修饰底物是蛋白质时, 有多种修饰模式^[13]。根据被修饰ADPr的数量, 可以分为单ADP-核糖基化(mono ADP-ribosylation, MArlylation)和多ADP-核糖基化(multil ADP-ribosylation)^[14]。根据ADPr是单体还是多聚状态, 还可分为单ADP-核糖基化和聚ADP-核糖基化(poly ADP-ribosylation, PARylation)两类。此外, 还有这几种模式的组合, 如多个单ADP-核糖基化(multil mono-ADP-ribosylation)、寡聚ADP-核糖基化(oligo ADP-ribosylation)、分支多聚ADP-核糖基化(branched

poly-ADP-ribosylation)、混合ADP-核糖基化(mixed ADP-ribosylation)等^[3,13]。因此, 按照反应类型, ARTs可分为催化形成单ADP-核糖基化的单ADP-核糖基转移酶(mono ADP-ribosyl transferases, mART)和催化形成聚ADP-核糖基化的聚ADP-核糖基转移酶(poly ADP-ribosyl polymerase, PARP)。细菌中绝大多数ARTs将单个ADPr分子转移到靶标蛋白上, 即为mART。只有少数白喉毒素家族的PARP成员才能合成多聚长链ADPr并进行修饰^[15]。此外, Sirtuins家族也具有ADP-核糖基化修饰的能力^[16]。

细菌ADP-核糖基水解酶由两类在进化上不同的蛋白质家族组成, 分别为Macrodomain水解酶(Macrodomain hydrolases, 称MacroD水解酶)和DraG样水解酶^[17]。MacroD水解酶包括MacroD样水解酶、聚ADP-核糖基水解酶(poly ADP-ribosyl glycohydrolase, PARG)、末端ADP-核糖基水解酶1(terminal ADPr glycohydrolase1-like, TARG1)及在嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)中新发现的一类Larg1^[18]。典型的MacroD水解酶结构包括由6个 β 折叠和5个 α 螺旋形成的一个“褶皱”, 而PARG还具有一个特殊的N端延伸螺旋结构, 可水解聚ADP-核糖基化底物, 目前在细菌中仅发现TcPARG和DrPARG两种^[19,20]。

2 细菌ARTs的结构特点

不同ARTs一级序列具有多样性, 仅凭氨基酸序列很难识别, 但催化核心区域结构相对保守。所有ARTs都包含一个分裂的 β 片层, 一般由六条链和一个下游螺旋元件组成^[8], 总体大小约35 Å×40 Å×55 Å^[21]。保守的活性位点基序分别位于第一、第二和第五条 β 链上, 形成催化三联体。根据催化三联体的组成, ARTs可分为H-Y-E/D, R-S-E和H-H-h(h为任何疏水残基)等几类^[8]。其中位于催化核心区域N端第一条链(β 链-1)上的组氨酸(H)/精氨酸(R), 负责与NAD⁺结合; 位于第五条链(β 链-5)上的谷氨酸(E)/天冬氨酸(D), 负责NAD⁺的水解, 研究表明这一关键残基的突变会使ARTs活性丧失^[22,23]。在整个反应过程中, NAD⁺被固定在核心区域形成的疏水裂隙结合口袋中^[24]。此外, 还有一类在结构和催化基序上不同, 但依赖NAD⁺的脱乙酰化酶—Sirtuin家族, 也具有ART活性, 及一些非经典类型的ARTs(表1)。

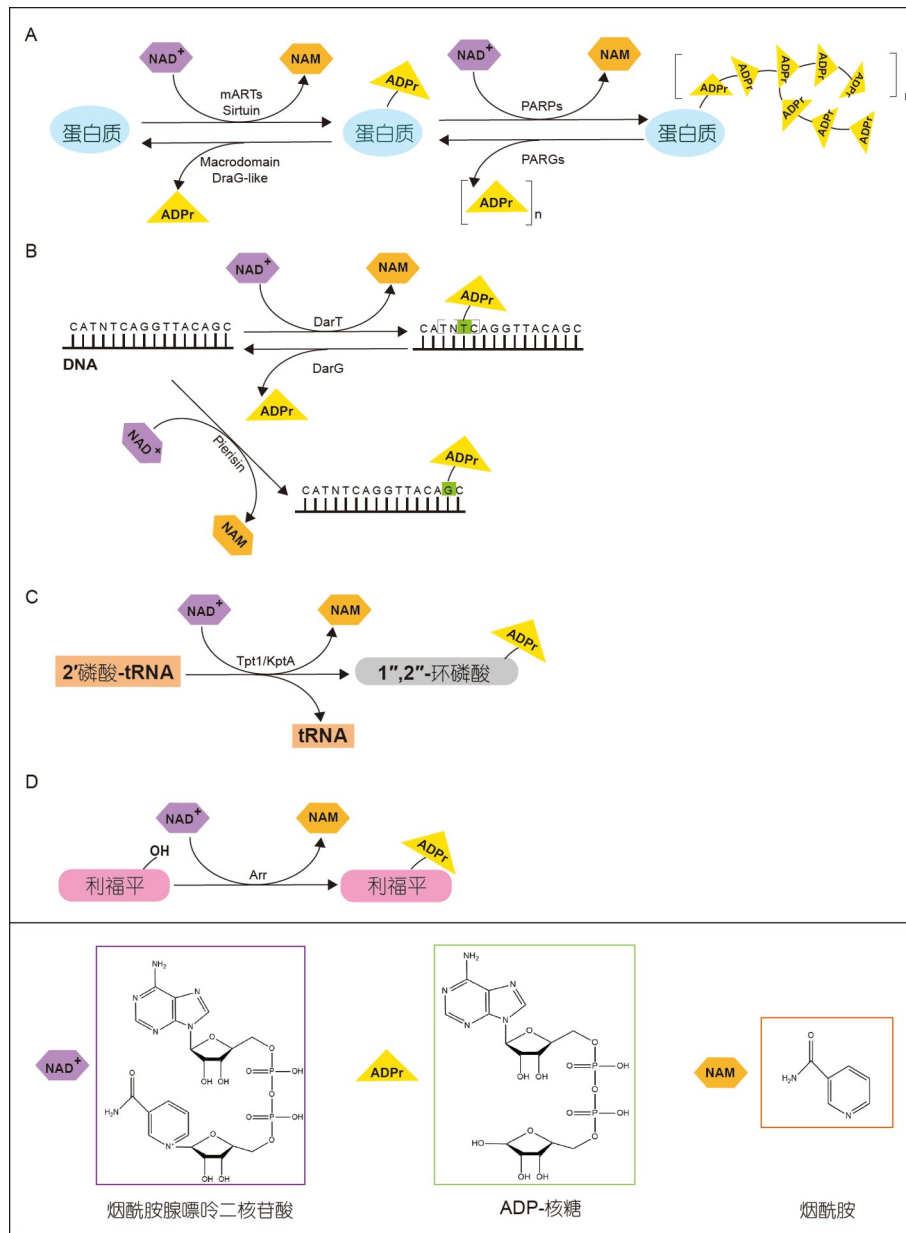


图 1 不同底物中的ADP-核糖基化修饰. A: 蛋白质中的ADP-核糖基化修饰; B: DNA中的ADP-核糖基化修饰; C: RNA中的ADP-核糖基化修饰; D: 小分子抗生素中的ADP-核糖基化修饰

Figure 1 ADP-ribosylation modification in different substrates. A: ADP-ribosylation in proteins; B: ADP-ribosylation in DNA; C: ADP-ribosylation in RNA; D: ADP-ribosylation in small molecule antibiotics

2.1 H-Y-E/D类ARTs

H-Y-E/D类ARTs以白喉毒素(diphtheria toxin, DTX)为代表, 还包括白喉类毒素、利福平ADP-核糖基转移酶(rifampin ARTs, Arr)等. 这一类ARTs催化核心区域具有H-Y-E/D基序, 即具有一个保守的His, 两个

Tyr(第一个严格保守)和一个Glu或Asp^[5]. His与ADPr的2'-OH和烟酰胺的-NH₂形成氢键, Tyr与烟酰胺环形成 π - π 堆积, 而Glu/Asp可以稳定活性氧碳鎗中间体^[25].

(1) 白喉毒素和白喉类毒素. 白喉毒素和白喉类毒素是H-Y-E/D类中的经典类型, 后者主要包括外毒素A(exotoxin A)、胆毒素(cholix toxin)和PARPs等.

表 1 细菌ADP-核糖基转移酶的分类、底物及靶向残基^{a)}

Table 1 Classification, substrates and target residues of bacterial ADP-ribosyltransferases^{a)}

ARTs	底物	靶向残基	基序	参考文献
H-Y-E/D				
Diphtheria toxin	eEF2	diphthamide-NH	SSY H GTKP KGF Y STDN AEGSSSV E YINN	[27,55]
Exotoxin A	eEF2	diphthamide-NH	VG Y HGTFL RGF Y IAGD EEEGGR L ETILG	[56]
Cholix toxin	eEF2	diphthamide-NH	VG Y HGTNH GGL Y VATH ESAGGE D ETVIG	[57]
CdPARP	—	—	NLF H GSRN NGI Y TASK GTYLKNT E FIVY	[30]
Arr	Rifampin	C ₂₃ -OH	AYL H GTKA NHI Y ITQT PEGAIED D PNVT	[9]
SCO2860	Rifampin	C ₂₃ -OH	PFF H GTKA NHI Y TAL RTWRER L DAMRL	[9]
Tre23 [*]	23S rRNA	helix 44	VFI H ATNK GK V YITDV IRSPSR L EYTHE	[58,59]
R-S-E				
Cholera toxin	G _{as}	Arg201	KLY R ADSR GYV S TSIS SPHPD E QEV S AL	[60]
Heat-labile enterotoxin	G _{as}	Arg	RLY R ADSR GYV S TSL S SPHP Y EQEV S AL	[61]
Iota-toxin	G-actin	Arg177	IV Y R RRSGP NF I S TSIG PGYAGE Y E V LLN	[62,63]
C2 toxin	G-actin	Arg177	IAY R RV D G SFS S TS L K SGFQ D EQ E ILLN	[64]
C3bot	RhoA, B, C	Asn41	MLF R GDDP IST S LMNV SAFAGQ L E M LLP	[65]
C3stau2	RhoA, B, C RhoE/Rnd3	—	YV Y R LLNL GYS S TQ L V TAYPGQ Q E V LLP	[66]
Pertussis toxin	G _{ai}	Csy351	TV Y R YDSR AFV S TSSS ALATYQ S E Y LAH	[67]
Scabin	DNA	Guanine-N2	TL Y R SDSR PYV S TTYD HKWADQ V E V AFP	[37]
TccC3	G-actin	Thr148	TL Y R ADNR VWV S TAIN HGPVNDA E ISFL	[68]
TccC5	RhoA	Gln61/63	VT Y R YDSR AYL S TAH GPQSGQ A E I LLP	[68]
MTX	EF-Tu	Arg	RLL R WDRR IFV S TTRA NPF P N E DEITFP	[69]
SpvB	G-Actin	Thr148	VV Y R GLKL AFM S TSPD AHFKGE A E M LFP	[70,71]
Tre1 [*]	FtsZ	Arg174	ET Y R GTTL GFM S TA K SKYK N E A E V L Y P	[10]
SdeA [*]	Ubiquitin	Arg 42	RLF R GLNL TNA S TTTE HGEG T E S EF S V Y	[72]
Ceg3 [*]	ANTs	Arg 236	ILV R ADGR AC A S TEDL GEHDGE K E E LVV	[72]
CteC [*]	Ubiquitin	Thr66	LYL R TVSD YW S SATFI GREVEPT E AKIC	[73]
H-H-h				
Tpt1	5'P-DNA 5'P-RNA	—	VLY H G T AR QYV H LSAD FYLGNDK V WLAD	[43]
SCO3953	5'P-RNA	—	YLY H G T VA HDV H LS P D FHVSANG V WLTQ	[74]
其他的ARTs				
Tre ^{Tu*}	EF-Tu	Asp21	TVGR R WMGP GTT H VAYP LVPTNEG W AKIV	[12]
RhsP2 [*]	dsRNA	2'-OH	IYY R TLSE SQE Y DGKL NNALFK L E A LKK	[11]
ParT [*]	Prs	Lys182, Ser202	SFW R IATD AIV Y AASS VIVPEET N LLIN	[52]
DarT [*]	ssDNA	thymidine	LREKKQA E FLVK	[53,54]
6b protein	Histone H3	—	Y-T-Y-Y	[51]

a) 红色标注是关键的氨基酸催化残基; 标“*”的为最新的研究进展

典型的白喉毒素由三个大小相近的结构域组成, 分别为: 催化结构域、易位或跨膜结构域和受体结合结构域^[26,27]。单体白喉毒素通常为“Y”字型结构, 其C端的

跨膜螺旋结构域和受体结合结构域负责结合受体并锚定到膜上^[28], 其催化结构域位于N端, 保守的催化三联体H-Y-E位于由三个β折叠、一个α螺旋和一个CL2柔

性环构成的裂缝中(图2A), 胆酸毒素整体结构与其相似(图2B). 在DTX中, His21和Tyr65参与NAD⁺结合, 而Glu148在催化中起关键作用. 白喉毒素在结合NAD⁺之前, CL2环会形成有序的空间结构并延伸到活性位点, 结合NAD⁺之后, 则会变得无序并导致酶活口袋的构象发生变化, 从而将负电荷区域更多地暴露出来, 并有利于底物蛋白eFE2上带正电荷的双苯二甲胺部分与酶活口袋的稳定结合^[29]. 之后, Glu148激活双苯二甲胺的吡咪唑氮, 对NAD⁺的N-糖苷键进行亲核攻击^[29]. 此外, 也有研究表明, 一些白喉类毒素具有聚ADP-核糖基转移酶功能, 也以H-Y-E作为催化三联体, 该基序中的Glu除了上述的功能外, 还可以与核糖形成氢键从而促进ADPr链的延伸^[30]. PARPs在细菌中的分布较少, 目前仅在白喉毒类毒素家族发现具有聚ADP-核糖基转移酶活性的ARTs, 但其是否参与细菌内源性代谢还未知^[15,30]. 对细菌PARPs结构的研究也相对较少, 已知来自橙色滑柱菌(*Herpetosiphon aurantiacus*)和艰难梭菌(*Clostridium difficile*)的PARP与人类PARP1在结构上非常相似, 这部分研究还在进行中^[15,30].

(2) 利福平ADP-核糖基转移酶. 利福平是一种有效治疗结核病和由金黄色葡萄球菌引起的感染的小分子抗生素药物, 它通过与DNA依赖性RNA聚合酶的 β 亚基结合带来空间位阻, 从而抑制细菌RNA的合成^[28]. 对利福平的耐药机制研究时发现, 利福平会被糖基化、ADP-核糖基化、单氧化或磷酸化修饰, 从而导致与RNA聚合酶的结合亲和力降低. 其中, 利福平ADP-核糖基转移酶基因在致病细菌和非致病细菌中广泛存在, 它编码的Arr可以将ADPr连接到利福平上, 形成ADP-核糖基化利福平, 从而导致利福平失效, 进而赋予细菌一定的耐药性^[9]. 已解析的耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)Arr同源蛋白结构表明, 它是一个单结构域蛋白, 分子量只有16 kD左右, 由两个反向平行的 β 折叠层(共包含7条 β 链)和两个 α 螺旋组成. 两个 α 螺旋之间形成一条深的裂隙以供利福平结合, 且第二个 α 螺旋的C末端柔性较强, 在结合利福平之后则形成了一条长的延伸环, 并提供了一个“帽子”式结构以协助固定利福平(图2C)^[9]. Arr与已知的细菌ARTs没有明显的序列保守性^[9], 且催化基序H-Y-E中严格保守的Glu残基也被Asp残基取代, 形成H-Y-D活性位点基序. 该天冬氨酸残基(Asp84)位于较不保守的第五条 β 链和第六条 β 链之间的底物结合环上, 在Arr中代替了

Glu残基的功能^[9]. 此外, 来自天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的SCO2860也是Arr的同源物, 也具有类似的功能(图2D)^[9].

2.2 R-S-E类ARTs

R-S-E类ARTs在细菌中分布较多, 以霍乱毒素(cholera toxin, CTX)为代表. 与H-Y-E/D类ARTs相比, 其位于第一条 β 链中的Arg起着与His相同的作用, 与NAD⁺的二磷酸主链形成静电相互作用, 将NAD⁺定位在活性位点; 位于第二条 β 链中的Ser-Thr-Ser(S-T-S)起着与芳香族残基Tyr相当的作用, Ser与烟酰胺核糖中的多个位置形成氢键, 稳定NAD⁺结合口袋; 位于第五条 β 链上的Gln/Glu-X-Glu(Q/E-X-E)起到水解NAD⁺的作用, 其中Gln/Glu促进ADPr向底物残基的转移, 第二个保守的Glu参与NAD⁺分子的水解^[25]. 除了保守的R-S-E催化基序, 该类ARTs在活性位点还具有一个特殊的ADP-核糖基化毒素转折环(ADP-ribosylating toxin turn-turn loop, ARTT loop)结构, 它由八个氨基酸组成: X-X- ϕ -X-X-E/Q-X-E(ϕ 表示芳香族氨基酸Phe, Trp和Tyr), 这种结构增加了活性位点的灵活性, 对识别特异性底物和靶向残基都十分重要^[21].

(1) 霍乱毒素家族. 根据结构和功能域的不同, 霍乱毒素家族又可进一步分为CT样(CT-like)毒素、C2样(C2-like)毒素和C3样(C3-like)毒素^[23]. CT样毒素是双链蛋白, 包含一个催化结构域和一个结合结构域, 主要代表有霍乱毒素、不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin)和百日咳毒素(pertussis toxin)等^[31]. 以CTX为例(图2E)^[32], CTX催化结构域由两部分组成, N端部分折叠方式与DTX的催化结构域非常相似, 具有ART活性, 是引起霍乱毒素发挥毒性作用的部分, 其后是由一条 α 螺旋形成的长链, 有助于在毒素输送过程中将催化结构域锚定到结合结构域(由五个亚基以非共价结合形式形成的五聚体), 进而与真核细胞表面受体结合, 促使具有ART活性的部分跨过细胞膜进入细胞发挥其功能. 因此该类毒素是一种异六聚体细菌蛋白毒素, 是“AB₅”型毒素的原型. C2样毒素同样是二元毒素, 同样包括两部分, 分别为约50 kD的A组分和一个约80 kD的B组分. 产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)产生的Iota毒素(Iota-toxin)是C2样毒素的典型代表, 是一种致死性毒素, 由Ia和Ib两部分组成(图2F)^[33]. 其中Ia具有ART活性, 是产生毒性作用的关键部分, 进

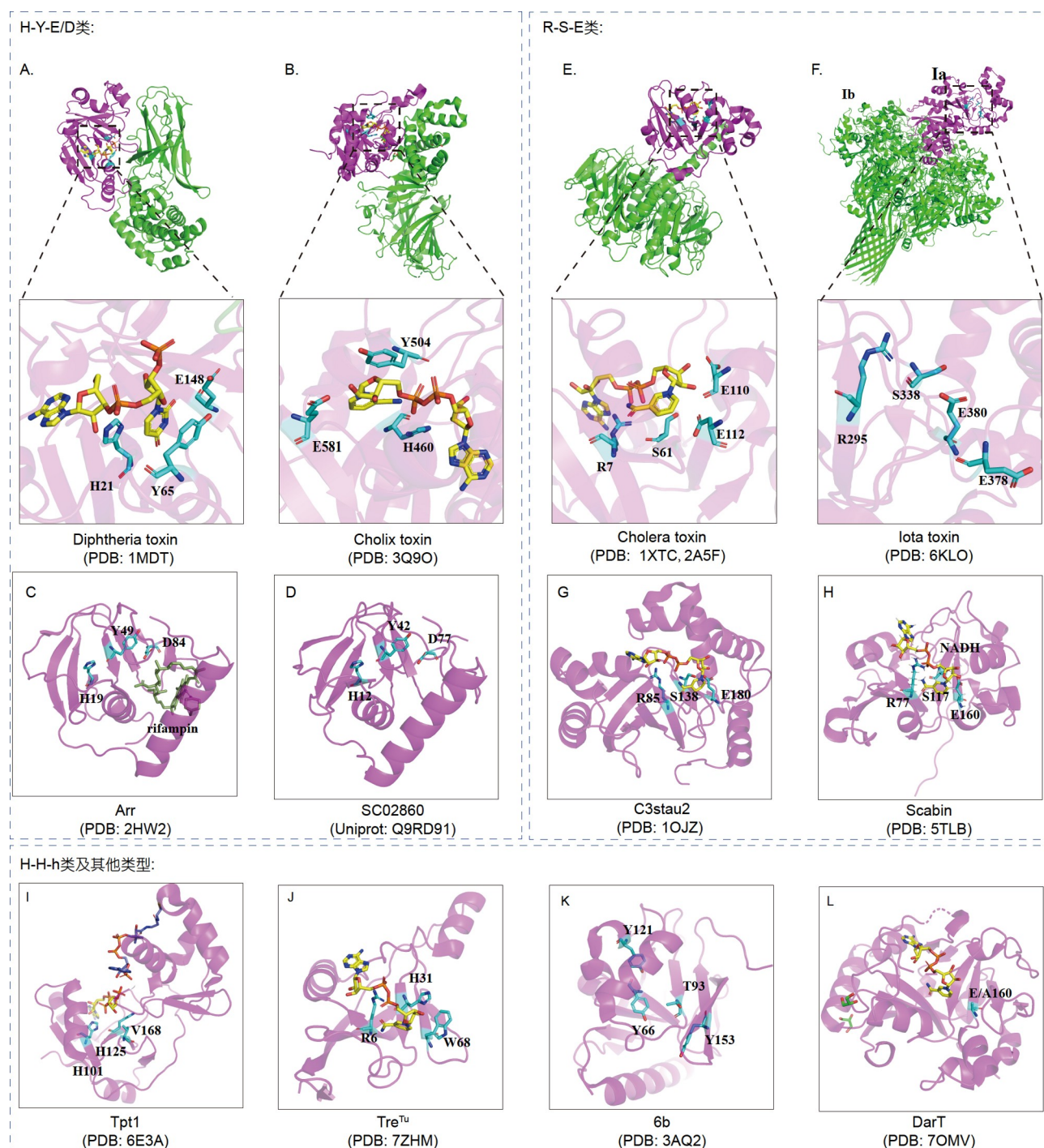


图 2 不同细菌ARTs的结构、催化核心结构和催化基序。催化核心包括六条链和螺旋，以粉色显示，其中H-Y-E/D、R-S-E等关键催化残基以棍棒模型展示(青色)；NAD⁺以棍棒模型显示(黄色)。图A~D展示H-Y-E/D类ARTs；图E~H展示R-S-E类ARTs；图I~L展示H-H-h类及其他类ARTs

Figure 2 Structures, catalytic cores and catalytic motifs of different bacterial ARTs. Catalytic core structures are shown in pink. H-Y-E/D and R-S-E key catalytic residues are shown as sticks models (cyan), and NAD or NAD analogs are shown as stick model (yellow). A~D: class H-Y-E/D ARTs, E~H: class R-S-E ARTs, and I~L: class H-H-h and other class ARTs

入宿主细胞后破坏细胞骨架从而使细胞发生裂解并死亡。Ib可以形成七聚体结构, 并与Ia绑定形成复合物, 并将其转送到宿主细胞内发挥毒性作用。C3样毒素是霍乱毒素家族中最小的一类, 仅由催化结构域组成, 是一种单链ADP-核糖基化毒素, 包括肉毒杆菌的C3外切酶(C3 exoenzyme, C3bot)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的C3Stau2(图2G)毒素等。在空间结构上, 折叠方式与霍乱毒素的催化结构域非常相似。尽管不同毒素在结构组织上存在差异, 但这些毒素的ART结构域的结构和活性位点基序都非常保守, 在底物的选择上也有一定的相似性。

(2) Pierisin和Pierisin样ARTs。Pierisin和Pierisin样ARTs是一小类主要针对DNA的细菌毒素。Pierisin最初在菜粉蝶(*Pieris rapae*)中被发现, 可对双链DNA鸟嘌呤碱基上的N2氨基进行修饰而导致靶细胞凋亡^[34]。土壤植物病原体疣状链霉菌(*Streptomyces scabies*)的Scabin与Pierisin一级序列同源性达40%^[35], 是马铃薯等植物的潜在毒力因子, 它还能对核苷、核苷酸、单链DNA和基因组DNA的鸟嘌呤碱基上的N2氨基进行修饰^[36,37]。Scabin也是只由一个结构域组成的单链蛋白, 包含一个典型的ART折叠, 并有保守的R-S-E基序(图2H)^[35]。同样, 天蓝色链霉菌的ScARP(也称SCO5461)与Scabin具有高度的结构相似性, 并且具有78.4%的序列同源性^[38], 也具有ART活性^[39]。

(3) 新发现的R-S-E类ARTs。随着研究的不断深入, 发现一些细菌效应蛋白也具有ADP-核糖基化修饰功能, 并且催化核心在结构上保守。最近报道的嗜肺军团菌T4SS(type IV secretion system, T4SS)效应蛋白SidEs^[40], Lpg0181(Lart1)^[41], Lpg0080(Ceg3)^[42]等也具有mART活性, 结构上呈现经典的ART折叠, 且R-S-E催化基序保守, 也可归于R-S-E类。同样, 广泛存在于病原菌中的T3SS(type III secretion system, T3SS)效应蛋白CteC也属于这一类^[11]。还有一些以毒性效应蛋白-免疫蛋白对(effector-immunity protein pairs, E-I pairs)的形式出现, 例如沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)的T6SS(type VI secretion system, T6SS)效应蛋白ADP-核糖基转移酶效应因子1(type VI secretion ADP-ribosyltransferase effector 1, Tre1)^[10](详见3.2)。

2.3 H-H-h类ARTs

细菌ARTs在进化过程中, 还形成了一类具有H-H-

h特征基序的分支, 即包括两个His和一个疏水氨基酸残基。这类ARTs在进化上最古老, 主要包括Tpt1(或KptA)和CC0527两个家族^[23]。Tpt1即酵母细胞中的tRNA 2'-磷酸转移酶(tRNA 2'-phosphotransferase), 在细菌中也称为KptA。Tpt1是前体tRNA剪接、成熟tRNA释放和参与ADP-核糖基化过程中必不可少的磷酸转移酶^[43]。热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的Tpt1蛋白结构已被解析(图2I), 它N端和C端各包含一个球状结构域, 并由一个长环连接起来。N端结构域具有螺旋-转角-螺旋家族的螺旋基序, C端结构域则呈现经典的ART折叠^[44]。虽然Tpt1/KptA的特征基序是H-H-V, 但这并非其真正的催化活性位点, 其催化活性位点由四个残基组成——R-H-R-R-, 并且在所有的Tpt1样蛋白中都保守。而CC0527家族蛋白在细菌中分布较少, 来自新月形杆菌(*Caulobacter crescentus*)的CC0527蛋白与Tpt1 C端结构域具有相似的结构, 并且也具有H-H-h基序^[45]。

2.4 Sirtuin家族和其他类型ARTs

Sirtuin是酵母沉默信息调节蛋白Sir2(silencing information regulator protein 2)的同源物, 即SIRT家族蛋白(SIRT family proteins), 是一种依赖NAD⁺的脱乙酰化酶^[46]。Sirtuins脱乙酰基的反应机理特殊而新颖, ART活性可能只是其脱乙酰化反应的中间步骤。Sirtuin核心结构域利用NAD⁺的脱乙酰化反应, 将底物蛋白的乙酰基转移至ADPr远端核糖基的O-2'位形成O-乙酰化ADP-核糖(O-acetyl-ADP-ribose, OAADPr)。在反应过程中Sirtuin会抓取NAD⁺中的ADPr将其与乙酰化蛋白的乙酰基-O连接形成ADPr-肽酰亚胺复合物中间体, 这个复合物很快会裂解形成OAADPr、烟酰胺和底物蛋白^[47], 这个反应过程就体现了Sirtuin的ART活性。研究较多的是哺乳动物的Sirtuin同源基因SIRT1~7, 其中SIRT1, SIRT6和SIRT7具有脱乙酰化和ADP核糖基化双重酶活性^[48,49]。Sir2同源物在细菌中也分布广泛, 研究表明耻垢分枝杆菌的SIRT4(MsSIRT4), 对精氨酸表现出强大的ADP-核糖基化修饰活性^[50]。但Sirtuin家族的ART活性相比其他ARTs活性较弱, 且不具备保守的H-Y-E/D或R-S-E催化基序。

近期研究发现, 有的ARTs虽然催化核心整体结构保守, 但具有非传统的催化基序。例如, 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)VI型分泌系统(T6SS)分泌

的抗菌蛋白Rhs^{main}, 它的C末端包含一个毒素蛋白结构域Tre^{Tu}, 其核心结构与ARTs催化核心相似, 但具有混合或非传统的催化三联体。它的催化三联体第一位氨基酸为Arg6, 但R-S-E中的第二、三位分别被His31和Trp68取代^[12], 从这点看又类似于KptA和CC0527家族中较不常见的H-H-h三联体(图2J)。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的T6SS毒素蛋白RhsP2, 保留了R-S-E类的Arg(R1490)和类似H-Y-D类的Tyr(Y1524), 起主要催化作用的氨基酸依旧为Glu(E1576)^[11]。放射性根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)Ti质粒(T-DNA)中的6b蛋白与多种参与植物细胞增殖的宿主蛋白相互作用, 体外实验表明其可能是一个新的细菌毒素家族。它在结构上也与经典ARTs相似, 但具有完全不同的催化基序Y-T-Y-Y(Tyr66-Thr93-Tyr121-Tyr153)(图2K), 并且可通过其ART活性干扰宿主miRNA途径来调节植物细胞的生长^[51]。

最近在一些细菌中还发现了一些较新颖的ARTs, 它们以毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统的方式出现, 其中毒素具有ART活性, 并且修饰的底物也具有多样性。ParST是通过生物信息学分析发现的新的TA对, 其中ParT是细菌中已知最小的mART, 与已知的ARTs没有序列同源性, 但结构相似, 催化基序由R-Y-N取代了H-Y-E^[52]。DarTG最初在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中发现, DarT可对DNA进行修饰, 而DarG充当水解酶的作用, 可以逆转该修饰^[53]。栖热水生菌(*Thermus* sp.)的DarT结构(图2L)显示, 保守的Glu160为主要的催化氨基酸, 且ARTT环比其他细菌ARTs中的要长, 有利于稳定底物DNA^[54]。

3 细菌ARTs的底物和靶向残基的识别机制

3.1 H-Y-E/D类ARTs的底物和靶向残基的识别机制

DTX类毒素的底物是真核宿主细胞内翻译延伸因子eEF2, 包括白喉棒状杆菌的白喉毒素^[55]、铜绿假单胞菌的外毒素A(ExoA)^[56]和霍乱弧菌的胆毒素^[57], 修饰发生在eEF2的亲核基团双苯二甲胺(diphthamide)上的环内-NH^[75]。由于双苯二甲胺位于靠近eEF2的反密码子识别区与核糖体P位点相互作用的区域, 被修饰上ADPr后, eEF2不能介导肽酰-tRNA的移位, 最终蛋白质合成终止^[76]。目前基于CTX和ExoA的单体结构和与底物的复合物等结构, 解释了该

修饰发生的酶活机制, 并提出了修饰位点构象变化介导的直接亲核取代反应机制^[77]。在没有底物的情况下, CTX/ExoA的NAD⁺结合位点被L1环遮挡, 而有NAD⁺和底物存在时, L1环发生摆动形成开放构象, 从而允许NAD⁺和底物的进入^[60,61,77]。ADP-核糖基化反应通过直接置换进行, CTX中的Glu148激活了双苯二甲胺的吡咪唑氮, 对NAD⁺的N-糖苷键进行亲核攻击^[29]。该反应遵循三级SN1机制, 首先催化三联体H-Y-E联合L1环固定NAD⁺, 并将其水解成NAM和活性氧碳鎓离子(oxacarbenium ion)中间体, 该中间体随后被底物eEF2的双苯二甲胺咪唑环上的N3原子进行亲核攻击, 形成ADPr-eEF2在此反应过程中, 活性位点L1环可以起到稳定活性氧碳鎓离子中间体, 并增强酶活反应中的偶极相互作用。

耻垢分枝杆菌的利福平ADP-核糖基转移酶MsArr, 以小分子抗生素利福平为催化底物。Arr-利福平复合物结构显示, 二者主要通过疏水作用结合。这表明反应机制可能是通过Asp84稳定并释放烟酰胺后形成的氧碳鎓过渡态进行的, 这使得利福平第23位C原子上的羟基能够攻击远端核糖的1位C原子^[9]。

目前, 细菌中还有几种PARPs具有在宿主细胞内进行聚ADP-核糖基化的能力, 并且具有保守的H-Y-E/D催化基序, 但其具体功能和作用靶标还不清楚, 有待深入研究。最近研究发现, 光杆菌(*Phototribacter laumondii*)VI型抗菌Rhs毒素Tre23, 也属于H-Y-E/D分支, 它通过修饰核糖体的23S rRNA, 削弱延伸因子G(EF-G)的GTPase活性, 进而影响翻译^[58]。

3.2 R-S-E类ARTs的底物和靶向残基的识别机制

大多数ARTs属于R-S-E类, 相比H-Y-E/D类, ARTT环对这一类ARTs在底物识别和靶向残基的高度选择性上具有重要作用。

在真核细胞中最常见的底物是肌动蛋白及其相关蛋白, 但修饰的氨基酸残基不同。以精氨酸为靶向残基的ARTs较多, CT样毒素中的霍乱毒素和大肠杆菌不耐热肠毒素修饰的底物都是肌动蛋白, 修饰发生在G_s(stimulatory heterotrimeric G-protein, G_s)α亚基的第201位精氨酸(Arg201), 导致G_{ss}活化, 进而激活cAMP信号通路^[78]。同样, C2样毒素中的Iota毒素、C2毒素以及VIP2毒素的底物也是肌动蛋白, 其中前两者可以修饰G-actin的第177位精氨酸残基(Arg177), 修饰后的肌动

蛋白由于ADPr基团带来的空间位阻, 导致无法聚合而解聚, 从而破坏细胞骨架而导致细胞变圆^[79]. 还有一些细菌毒素, 修饰位点同样是肌动蛋白的Arg177, 如沙门氏菌(*Salmonella*)中的SpvB^[70,71]. 而百日咳毒素特异性修饰G_i(inhibitory trimeric G-protein, G_i) α 亚基上的第351位半胱氨酸(Cys351)残基^[67], 在该位点发生修饰将导致G蛋白与GPCRs解偶联, 使得G_o处于与GDP结合的非活化状态, 无法诱导细胞内cAMP的产生, 从而终止信号通路的传递^[67]. 发光杆菌Tc毒素复合体中的TccC3^[68]特异性修饰肌动蛋白第148位苏氨酸残基(Thr148), 从而降低肌动蛋白与胸腺肽 β 4的亲和力, 促进肌动蛋白的聚合^[80]. 由此可见, 当修饰的底物都是肌动蛋白时, 因其靶向残基的不同, 会带来不一样的生理结果. 这种对底物和靶向残基的特异性选择的机制, 目前基于Ia-actin复合物结构的相关研究, 提出了NAD⁺介导的strain-alleviation模型来解释这种对底物和靶向残基特异性选择的机制^[62]. Iota毒素的Ia ARTT环上的芳香族氨基酸Tyr375的侧链刚好嵌入肌动蛋白的疏水口袋中, 并与主链上Leu110的羰基氧原子形成氢键, 从而在底物识别中发挥重要作用. 由于ARTT环、目标残基Arg177和NAD⁺三者之间的距离较远, 在发生ART反应时, 需要发生一定的构象变化和重排. 经SN1机制将NAD⁺水解后, Ia可将ADPr上的AMP部分抓住, 而剩下的磷酸核糖部分通过焦磷酸键转向朝目标残基靠近, 导致ADPr的构象发生“转动”. 肌动蛋白的Arg177和Ia毒素ARTT环上的Glu378通过形成氢键相互作用而诱导Arg177发生重排, 有利于反应的进行. 最后Arg177的亲核基团N原子对ADPr进行亲核攻击, 形成ADPr-Actin^[62].

C3类毒素的底物是肌动蛋白骨架调节因子Rho家族的GTPase. 肉毒杆菌的C3bot特异性地对RhoA, B, C上的第41位天冬酰胺(Asn41)残基进行修饰^[65], 发生修饰后处于活化状态的Rho仍能与效应蛋白结合并相互作用^[81], 但与未修饰状态相比表现出与鸟苷酸解离抑制剂(guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI)的高亲和力而抑制肌动蛋白的聚合^[82]. 金黄色葡萄球菌的C3Stau2是C3bot的同源毒素, 不仅可以修饰RhoA, B, C, 还可以修饰RhoE/Rnd3^[66]. 除了C3样毒素, 上文提及的发光杆菌Tc毒素复合体中的另一形式的TccC5也可对RhoA进行修饰, 但靶向残基不是Asn41, 而是第63位谷氨酰胺(Gln63)^[68].

Pierisin类毒素的底物主要是DNA. 土壤植物病原体疣状链霉菌(*Streptomyces scabiei*)的Scabin可以对核苷酸、单链或双链DNA和基因组DNA的鸟嘌呤碱基上的N2氨基(Guanine-N2)进行ADP-核糖基化, 催化形成N₂-ADP-核糖-1-2'-脱氧鸟苷[N₂-(ADP-ribos-1-yl)-2'-deoxyguanosine]^[35]. 天蓝色链霉菌的SCO5461(也称ScARP)与Scabin在一级序列和三级结构上具有高度相似性, 也属于Pierisin家族毒素, 但修饰位点主要是鸟苷及其大部分衍生物上的N2氨基^[38]. 而球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)的杀蚊毒素(Mosquitocidal toxin, MTX)的底物不是DNA, 而是大肠杆菌中的翻译延伸因子EF-Tu(elongation factor Tu), 修饰发生在Arg上, 导致EF-Tu不能与GTP和氨酰-tRNA形成稳定的三元复合物, 从而抑制细菌蛋白质的合成^[69].

新发现的R-S-E类ARTs的底物具有多样性, 例如, 在嗜肺军团菌中发现的多个ARTs修饰的底物都不同. SidEs家族可特异性核糖基化修饰泛素(ubiquitin, Ub)分子上的第42位精氨酸残基(Arg42)^[40], 通过非经典泛素途径对真核细胞中的蛋白进行泛素化修饰, 进而调节蛋白质的活性和功能. Lpg0080和Lpg0081这一对效应蛋白能够通过ADP/ATP转运酶(ADP/ATP translocases, ANTs)进行可逆ADP-核糖基化修饰, 协同调控线粒体的能量转运过程. 其中Lpg0080具有ART活性, 可对ANTs上的Arg236进行修饰, 而Lpg0081具有ARH活性, 属于一类新的ADP-核糖基水解酶^[83]. 广泛存在于病原菌中的T3SS效应蛋白CteC可对宿主体内的泛素上的Thr66进行特异性修饰, 从而阻断宿主泛素信号传导^[73]. 以E-I蛋白对形式出现的变形沙雷氏菌的Tre1可特异性修饰竞争细菌FtsZ上的第174位精氨酸(Arg174), 抑制肌动蛋白聚合而导致细胞因无法分裂而不断延长, 且细菌本身会同时表达免疫蛋白Tri1通过发挥去修饰或封闭酶活中心的双机制消除Tre1对自身造成的毒性^[10].

3.3 H-H-h类ARTs的底物和靶向残基的识别机制

H-H-h分支中的Tpt1, 在大肠杆菌中十分保守, 它的底物主要是tRNA, 其ART活性便体现在其对tRNA前体的剪切过程. 它通过两步反应去除剪接连接处产生的2'-磷酸而产生成熟tRNA: 首先, tRNA的2'-磷酸对NAD⁺中核糖的C_{1'}进行亲核攻击, 形成2'-磷酸-ADP核糖基化RNA中间体, 并释放出烟酰胺. 随后, ADPr末端

的2'-OH与tRNA2'-磷酸发生酯交换反应取代tRNA产物,同时生成ADPr-1'', 2''-环磷酸^[84]。

3.4 Sirtuin家族和其他类型ARTs的底物和靶向残基的识别机制

Sirtuin家族的ARTs的相关研究还较少,已在上文2.4进行阐述。以TA系统形式出现的ARTs,它们修饰的底物既可以是蛋白质,也可以是核酸。例如,来自鞘氨醇菌(*Sphingobium* sp. YBL2)的PraT特异性修饰大肠杆菌磷酸核糖焦磷酸合成酶(phosphoribosyl pyrophosphate synthetase, Prs)上的Lys182或Ser202,通过干扰核苷酸生物合成诱导细菌生长停滞,而ParS可通过结合作用封闭ParT的酶活中心来中和ParT的毒性^[52]。来自结核分枝杆菌和肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*)的DarT分别特异性地使单链DNA的TNTC基序和TTT或TCT基序发生ADP核糖基化,进而阻止DNA的复制^[54]。DarT与ssDNA的复合物的结构表明,底物识别依赖于DNA磷酸核糖骨架的正电性凹槽,且Arg51侧链具有高度灵活性,可以辅助与NAD⁺和DNA的结合,反应也是通过SN1机制进行^[54]。有趣的是,在研究过程中发现DarTG的同源物DarTG1和DarTG2可以保护大肠杆菌免受噬菌体侵染,但噬菌体在进化过程中也通过产生抵抗该系统的抗DarT蛋白或突变自身DNA聚合酶来防御细菌的DarTG系统,该方面的研究揭示了TA系统中毒素功能的多样性,为细菌抵抗噬菌体的感染提供新的防御机制^[85]。此外,还有以RNA为底物的细菌毒素蛋白,最近报道的铜绿假单胞菌的RhsP2以细菌RNA为底物,以非序列特异性的方式对tRNA, RNA加工核酶和核糖核酸酶P等细菌体内重要的RNA进行修饰,对双链RNA上的2'-OH发生ADP-核糖基化,抑制蛋白翻译并破坏tRNA加工,进而导致细胞死亡^[11]。

4 总结

随着科学研究的不断深入,人们对ADP-核糖基化系统的认识逐渐加深,发现该修饰广泛地参与了一些

重要的细胞生命过程,如DNA复制及损伤修复、信号转导、应激和感染反应等^[3,24]。尽管目前对ARTs的相关研究在真核生物中更加广泛和深入,但近期一些研究表明细菌ARTs不仅分布广泛,而且还参与了微生物的种间/种内竞争以及致病过程。因此,细菌ARTs的鉴定、靶向的宿主底物及致病机理的研究引起了科学界及生物医药界的关注。

细菌的ARTs普遍具有“毒性”,它们通过不同的分泌系统进入宿主细胞或者参与细菌竞争,并且针对不同的底物进行修饰从而调控不同的生命过程^[86]。ARTs最常见的底物是具有G蛋白结构域的蛋白质,这是一种普遍保守的结构,通过水解GTP以在激活和失活状态之间切换^[12]。G结构域蛋白包括翻译因子相关(如EF-Tu, eEF2)、细胞骨架调节蛋白(如Rho)、GTP水解蛋白(如细菌分裂相关蛋白FtsZ)等。大多数ARTs修饰发生在精氨酸残基胍基、谷氨酰胺或天冬酰胺侧链的酰胺基的NH₂上。而聚ADP-核糖基转移酶(PARP)的H-Y-E进化分支修饰亲核氨基酸,主要是谷氨酸和天冬氨酸^[25,87]。

目前,对于细菌中的ADP-核糖基化系统作用的分子作用机制还尚未明晰,如Tc毒素的TccC3特异性靶向Thr残基背后的机制尚未了解、对细菌PARP的结构和功能的研究还处于起步阶段、MTX具体靶向的Arg残基尚不清楚等。这些可通过解析毒素与底物的复合物结构来解决。Sirtuins, ParT和Tpt1缺乏关键的R-S-E或H-Y-E/D催化基序,反应机制与一般的ARTs可能不同,这都是有待挖掘的地方。还有,ARTs修饰的底物不仅仅是蛋白质、DNA、小分子抗生素,还可以是RNA。这种ART靶向底物的多样性,可揭示全新的细菌拮抗机制,为开发新型抗生素开辟新的途径。此外,ADP-核糖基化介导的许多反应在人类感染性疾病的发病机制中起主导作用,并且随着后抗生素时代的来临,许多病原菌正对现有的抗生素药物产生耐药性,因此寻找抗生素替代物的工作任重道远。展望未来,致力于ARTs结构和功能的研究,有助于人们对ARTs底物和关键靶残基之间互作机制产生新的认识,也有望为疾病治疗提供靶点。

参考文献

- 1 Chen N, Kong X, Zhao S, et al. Post-translational modification of baculovirus-encoded proteins. *Virus Res*, 2020, 279: 197865

- 2 Liu J, Qian C, Cao X. Post-translational modification control of innate immunity. *Immunity*, 2016, 45: 15–30
- 3 Yan Z Z, Yang X Y, Wang Y G, et al. Progress in reversible ADP- ribosylation modification in DNA damage repair and cancer treatment (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2021, 51: 1218–1228 [闫珍珍, 杨肖云, 王亚光, 等. ADP-核糖基化可逆修饰在DNA损伤应答及癌症治疗中的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1218–1228]
- 4 Zhang L L, Dong Q, Chen M Z. The roles of protein acetylation in viral life cycle (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2022, 52: 1369–1376 [张林亮, 董琪, 陈明周. 蛋白质乙酰化修饰作用于病毒生命周期的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1369–1376]
- 5 Mikolcevic P, Hlousek-Kasun A, Ahel I, et al. ADP-ribosylation systems in bacteria and viruses. *Comput Struct Biotech J*, 2021, 19: 2366–2383
- 6 Gupte R, Liu Z, Kraus W L. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev*, 2017, 31: 101–126
- 7 Rechkunova N I, Maltseva E A, Lavrik O I. Post-translational modifications of nucleotide excision repair proteins and their role in the DNA repair. *Biochemistry*, 2019, 84: 1008–1020
- 8 Aravind L, Zhang D, de Souza R F, et al. The natural history of ADP-ribosyltransferases and the ADP-ribosylation system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, 384: 3–32
- 9 Baysarowich J, Koteva K, Hughes D W, et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: structure and diversity of Arr. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4886–4891
- 10 Ting S Y, Bosch D E, Mangiameli S M, et al. Bifunctional immunity proteins protect bacteria against FtsZ-targeting ADP-ribosylating toxins. *Cell*, 2018, 175: 1380–1392.e14
- 11 Bullen N P, Sychantha D, Thang S S, et al. An ADP-ribosyltransferase toxin kills bacterial cells by modifying structured non-coding RNAs. *Mol Cell*, 2022, 82: 3484–3498.e11
- 12 Jurėnas D, Rey M, Byrne D, et al. *Salmonella* antibacterial Rhs polymorphic toxin inhibits translation through ADP-ribosylation of EF-Tu P-loop. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 13114–13127
- 13 O’Sullivan J, Tedim F M, Gagné J P, et al. Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation. *Nat Commun*, 2019, 10: 1182
- 14 Hottiger M O, Hassa P O, Lüscher B, et al. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 208–219
- 15 Perina D, Mikoč A, Ahel J, et al. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. *DNA Repair*, 2014, 23: 4–16
- 16 Hawse W F, Wolberger C. Structure-based mechanism of ADP-ribosylation by sirtuins. *J Biol Chem*, 2009, 284: 33654–33661
- 17 Rack J G M, Palazzo L, Ahel I. (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology. *Genes Dev*, 2020, 34: 263–284
- 18 Fu J, Li P, Guan H, et al. *Legionella pneumophila* temporally regulates the activity of ADP/ATP translocases by reversible ADP-ribosylation. *mLife*, 2022, 1: 51–65
- 19 Sharifi R, Morra R, Denise Appel C, et al. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J*, 2013, 32: 1225–1237
- 20 Cho C C, Chien C Y, Chiu Y C, et al. Structural and biochemical evidence supporting poly ADP-ribosylation in the bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Nat Commun*, 2019, 10: 1491
- 21 Han S, Tainer J A. The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *Int J Med Microbiol*, 2002, 291: 523–529
- 22 Wilson B A, Reich K A, Weinstein B R, et al. Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry*, 1990, 29: 8643–8651
- 23 Simon N C, Aktories K, Barbieri J T. Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 599–611
- 24 Yoshida T, Tsuge H. Common mechanism for target specificity of protein- and DNA-targeting ADP-ribosyltransferases. *Toxins*, 2021, 13: 40
- 25 Cohen M S, Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 236–243
- 26 Choe S, Bennett M J, Fujii G, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, 1992, 357: 216–222
- 27 Bell C E, Eisenberg D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry*, 1996, 35: 1137–1149
- 28 Bennett M J, Eisenberg D. Refined structure of monomelic diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci*, 1994, 3: 1464–1475
- 29 Gillet D, Barbier J. (2015). 4-Diphtheria toxin. In: Alouf J E, Ladant D, Popoff M R, eds. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. 4th ed. Boston: Academic Press, 111–132

- 30 Garcia-Saura A G, Zapata-Pérez R, Hidalgo J F, et al. Comparative inhibitory profile and distribution of bacterial PARPs, using *Clostridioides difficile* CD160 PARP as a model. *Sci Rep*, 2018, 8: 8056
- 31 Carbonetti N H. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog Dis*, 2015, 73: ftv073-ftv
- 32 Zhang R G, Scott D L, Westbrook M L, et al. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J Mol Biol*, 1995, 251: 563–573
- 33 Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, et al. Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27: 288–296
- 34 Nakano T, Takahashi-Nakaguchi A, Yamamoto M, et al. (2015). Pierisins and CARP-1: ADP-Ribosylation of DNA by ARTCs in butterflies and shellfish. In: Koch-Nolte F, ed. *Endogenous ADP-Ribosylation*. Cham: Springer International Publishing, 127–149
- 35 Lyons B, Ravulapalli R, Lanoue J, et al. Scabin, a Novel DNA-acting ADP-ribosyltransferase from *Streptomyces scabies*. *J Biol Chem*, 2016, 291: 11198–11215
- 36 Oda T, Hirabayashi H, Shikauchi G, et al. Structural basis of autoinhibition and activation of the DNA-targeting ADP-ribosyltransferase pierisin-1. *J Biol Chem*, 2017, 292: 15445–15455
- 37 Lyons B, Lugo M R, Carlin S, et al. Characterization of the catalytic signature of Scabin toxin, a DNA-targeting ADP-ribosyltransferase. *Biochem J*, 2018, 475: 225–245
- 38 Yoshida T, Tsuge H. Substrate N2 atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP. *J Biol Chem*, 2018, 293: 13768–13774
- 39 Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, et al. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon*, 2013, 63: 55–63
- 40 Wang Y, Shi M, Feng H, et al. Structural insights into non-canonical ubiquitination catalyzed by side. *Cell*, 2018, 173: 1231–1243.e16
- 41 Black M H, Osinski A, Park G J, et al. A *Legionella* effector ADP-ribosyltransferase inactivates glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100301
- 42 Fu J, Zhou M, Gritsenko M A, et al. *Legionella pneumophila* modulates host energy metabolism by ADP-ribosylation of ADP/ATP translocases. *eLife*, 2022, 11: e73611
- 43 Yang S, Qu G, Fu B, et al. The function of KptA/Tpt1 gene—a minor review. *Funct Plant Biol*, 2020, 47: 577
- 44 Gajiwala K S, Burley S K. Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10: 110–116
- 45 Aravind L. Guilt by association: contextual information in genome analysis. *Genome Res*, 2000, 10: 1074–1077
- 46 Flick F, Lüscher B. Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 29
- 47 Haigis M C, Sinclair D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2010, 5: 253–295
- 48 Mitra N, Dey S. Biochemical characterization of mono ADP ribosyl transferase activity of human sirtuin SIRT7 and its regulation. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 680: 108226
- 49 Rack J G M, Morra R, Barkauskaite E, et al. Identification of a class of protein ADP-ribosylating sirtuins in microbial pathogens. *Mol Cell*, 2015, 59: 309–320
- 50 Tan Y, Xu Z, Tao J, et al. A SIRT4-like auto ADP-ribosyltransferase is essential for the environmental growth of *Mycobacterium smegmatis*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 48: 145–152
- 51 Wang M, Soyano T, Machida S, et al. Molecular insights into plant cell proliferation disturbance by *Agrobacterium* protein 6b. *Genes Dev*, 2011, 25: 64–76
- 52 Piscotta F J, Jeffrey P D, Link A J. ParST is a widespread toxin-antitoxin module that targets nucleotide metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 826–834
- 53 Jankevicius G, Ariza A, Ahel M, et al. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA. *Mol Cell*, 2016, 64: 1109–1116
- 54 Schuller M, Butler R E, Ariza A, et al. Molecular basis for DarT ADP-ribosylation of a DNA base. *Nature*, 2021, 596: 597–602
- 55 Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, et al. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*, 1968, 243: 3553–3555
- 56 Iglewski B H, Kabat D. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 2284–2288
- 57 Jørgensen R, Purdy A E, Fieldhouse R J, et al. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, 2008, 283:

10671–10678

- 58 Jurénas D, Payelleville A, Roghanian M, et al. *Phototrhhabdus* antibacterial Rhs polymorphic toxin inhibits translation through ADP-ribosylation of 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 8384–8395
- 59 Jurénas D, Rosa L T, Rey M, et al. Mounting, structure and autocleavage of a type VI secretion-associated Rhs polymorphic toxin. *Nat Commun*, 2021, 12: 6998
- 60 O'Neal C J, Jobling M G, Holmes R K, et al. Structural basis for the activation of cholera toxin by human ARF6-GTP. *Science*, 2005, 309: 1093–1096
- 61 van den Akker F, Merritt E A, Pizza M G, et al. The Arg7Lys mutant of heat-labile enterotoxin exhibits great flexibility of active site loop 47–56 of the A subunit. *Biochemistry*, 1995, 34: 10996–11004
- 62 Tsurumura T, Tsumori Y, Qiu H, et al. Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 4267–4272
- 63 Vandekerckhove J, Schering B, Bärman M, et al. *Clostridium perfringens* iota toxin ADP-ribosylates skeletal muscle actin in Arg-177. *FEBS Lett*, 1987, 225: 48–52
- 64 Schleberger C, Hochmann H, Barth H, et al. Structure and action of the binary C2 toxin from *Clostridium botulinum*. *J Mol Biol*, 2006, 364: 705–715
- 65 Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8602–8605
- 66 Evans H R, Sutton J M, Holloway D E, et al. The crystal structure of C3stau2 from *Staphylococcus aureus* and its complex with NAD. *J Biol Chem*, 2003, 278: 45924–45930
- 67 Katada T. The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 2103–2111
- 68 Lang A E, Schmidt G, Schlosser A, et al. *Phototrhhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science*, 2010, 327: 1139–1142
- 69 Schirmer J, Wieden H J, Rodnina M V, et al. Inactivation of the elongation factor Tu by mosquitocidal toxin-catalyzed mono-ADP-ribosylation. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 4894–4899
- 70 Otto H, Tezcan-Merdol D, Girisch R, et al. The spvB gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl) transferase. *Mol Microbiol*, 2000, 37: 1106–1115
- 71 Lesnick M L, Reiner N E, Fierier J, et al. (2001). The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol*. 39: 1464–1470
- 72 Dong Y, Mu Y, Xie Y, et al. Structural basis of ubiquitin modification by the *Legionella* effector SdeA. *Nature*, 2018, 557: 674–678
- 73 Yan F, Huang C, Wang X, et al. Threonine ADP-ribosylation of ubiquitin by a bacterial effector family blocks host ubiquitination. *Mol Cell*, 2020, 78: 641–652.e9
- 74 Munnur D, Bartlett E, Mikolčević P, et al. Reversible ADP-ribosylation of RNA. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 5658–5669
- 75 Liu S, Milne G T, Kuremsky J G, et al. Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 9487–9497
- 76 Mateyak M K, Kinzy T G. ADP-ribosylation of translation elongation factor 2 by diphtheria toxin in yeast inhibits translation and cell separation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 24647–24655
- 77 Jorgensen R, Wang Y, Visschedyk D, et al. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. *EMBO Rep*, 2008, 9: 802–809
- 78 Cassel D, Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 2669–2673
- 79 Margarit S M, Davidson W, Frego L, et al. A steric antagonism of actin polymerization by a *Salmonella* virulence protein. *Structure*, 2006, 14: 1219–1229
- 80 Aktories K, Schmidt G, Lang A E. *Phototrhhabdus luminescens* toxins TccC3 and TccC5: insecticidal ADP-ribosyltransferases that modify threonine and glutamine. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, 384: 53–67.
- 81 Genth H, Schmidt M, Gerhard R, et al. Activation of phospholipase D1 by ADP-ribosylated RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302: 127–132

- 82 Genth H, Gerhard R, Maeda A, et al. Entrapment of Rho ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28523–28527
- 83 Kubori T, Lee J, Kim H, et al. Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired *Legionella* effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2122872119
- 84 Banerjee A, Munir A, Abdullah L, et al. Structure of tRNA splicing enzyme Tpt1 illuminates the mechanism of RNA 2'-PO₄ recognition and ADP-ribosylation. *Nat Commun*, 2019, 10: 218
- 85 LeRoux M, Srikant S, Teodoro G I C, et al. The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defence by ADP-ribosylating viral DNA. *Nat Microbiol*, 2022, 7: 1028–1040
- 86 Deng Q, Barbieri J T. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol*, 2008, 62: 271–288
- 87 Vyas S, Matic I, Uchima L, et al. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat Commun*, 2014, 5: 4426

Structural basis and research progress of bacterial ADP-ribosyltransferase

WU Huan¹, OUYANG SongYing^{1,2} & GUAN HongXin¹

*1 College of life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;
2 FJNU Biomedical Research Center of South, Fuzhou 350117, China*

ADP-ribosylation is a widespread post-translational modification of proteins in organisms catalyzed by adenosine diphosphate ribosyltransferases (ARTs). Bacterial ARTs regulate the various life processes of host cells by transferring ADP-ribose from NAD⁺ to specific substrates, ultimately helping them to reproduce and infect. To date, it has been found that in addition to classical ARTs, bacterial toxin-antitoxin systems or effector proteins can also act as ARTs, recognizing a wide range of substrates and being involved in a more diverse range of life processes. This article summarizes the classical ARTs and toxins/antitoxins or effector proteins with ADP-ribosylation modification function, and reviews their structural characteristics and specificity and mechanisms of targeting substrates and residues. It will help us to understand the bacterial ribosylation modification and elucidate the pathogenic mechanism of important pathogenic bacteria based on the ADP-ribosylation modification system, and it will also provide a reference for identifying new therapeutic targets.

ADP ribosyltransferase, classification, structure, substrate, targeted residues

doi: [10.1360/SSV-2023-0082](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0082)