

锌指蛋白与心脏发育^①

王 俊, 袁葵洲, 吴秀山

(湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘 要: 锌指是最大的 DNA 结合蛋白家族, 是最普遍的核酸识别元件. 近年来发现锌指参与生物体的基因转录, 复制及蛋白质的合成等各种基因调节和控制过程, 心脏发育过程中涉及大量锌指基因. 综述了心脏发育过程中起重要调控作用的锌指蛋白以及它们的作用机制.

关键词: 心脏发育; 锌指蛋白; 转录因子

中图分类号: Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2003)S0-0049-04

Zinc Finger Protein and Heart Development

WANG Jun, YUAN Wú-zhou, WU Xiú-shan

(Colleges of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Within the known classes of DNA binding proteins, the zinc finger is the largest family and the most common motif for nucleic acids recognition. In the past decade, it is found that zinc finger proteins are involved in the gene transcription, duplication and protein synthesis processes as a regulator and mediator, and a large number of zinc finger genes are involved in cardiac development. Zinc finger proteins which play important roles in heart development and their regulate mechanism are reviewed.

Key words: heart development; zinc finger protein; transcription factors

(*Life Science Research*, 2003, 7(2): 49~ 52)

生物体中, 基因转录调控因子发挥作用时, 主要有 4 种空间模式: 螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix)、亮氨酸拉链 (leucine zipper)、锌指 (zinc finger) 和 β 带 (β ribbon), 而锌指蛋白是在真核生物中最普遍存在的一类核酸结合蛋白. 自从在非洲爪蟾转录因子 TFIIIA 中发现了第一个锌指以来, 已在 560 多种蛋白中发现了 4 100 多种不同的锌指序列, 使得锌指元件成为 DNA 结合蛋白中最庞大的一个家族^[1]. 它们通常含有由保守的半胱氨酸、组氨酸和疏水氨酸组成的特征序列-Tyr/

Phe-X-Cys-X₂-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃-His-
(X 为任意氨基酸), 序列长约 30 个氨基酸^[2].

锌指类结构根据锌的配位和结构域的性质可分为锌指 (zinc finger)、锌扭 (zinc twist)、锌带 (zinc ribbon) 和锌簇 (zinc cluster) (见图 1), 它们的特征氨基酸序列、中心金属配位性质、结构域构象以及与 DNA 作用的方式均有所不同 (见表 1). 心脏发育过程中所涉及的锌指类蛋白结构域大多为 Cys₂His₂ 配位, 也有以激素受体为代表的 Cys₂Cys₂ 配位. 它们的共同特点是由螺旋 (或折叠)-环-螺

① 收稿日期: 2003-05-22; 修回日期: 2003-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3017049; 30270644; 3021010392); 国家科技部 973 前期项目 (2002CC00100); 教育部重点课题项目

作者简介: 王 俊 (1981-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 从事分子发育遗传学研究; 袁葵洲 (1966-), 女, 湖南衡阳人, 湖南师范大学副教授, 从事分子发育遗传学研究; 吴秀山 (1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学特聘教授, 博士生导师, 通讯作者, 从事分子发育遗传学研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com

旋(或折叠)所构成的超二级结构,并络合 Zn 离子形成的空间构象。此外,它们还具有以下独特的特点:结构上相对保守,与 DNA 作用相对简单,识别 DNA 序列高度特异,识别特异性又具有相当的可

塑性;良好的模块组织特性,识别核酸序列的相容性与多样性。锌指不仅可以结合于 DNA,还能与 RNA, DNA-RNA 杂交体和其他锌指蛋白结合,控制生物体中蛋白的转录和翻译过程。

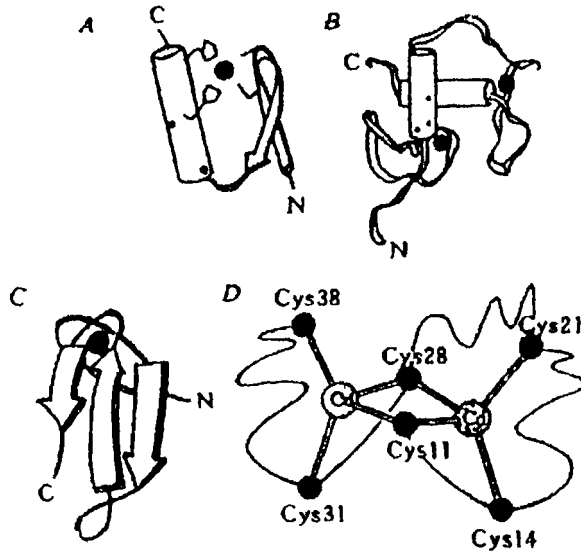


图 1 4种常见锌指类蛋白的结构^[3]

A: 锌指; B: 锌扭; C: 锌带; D: 锌簇

Fig.1 Structures of 4 common zinc finger proteins

A: zinc finger; B: zinc twist; C: zinc ribbon; D: zinc cluster

表 1 锌指类蛋白的类型及结构特点

Table 1 Types and structure characters of zinc finger proteins

类型	锌和配体	结构特点	识别 DNA 序列	示例	序列
Type	Zinc and ligand	Structure character	Recognizable DNA sequence	Example	Sequence
锌指	ZnCys ₂ His ₂ 1Zn 位点	反平行折叠, 转折 螺旋指状突起	GCG GCG 5'-CGGTGGCG-3'	TFIIIA Zif268	CX ₄ G-X ₁₂ H-X ₄ H-
锌扭	(ZnCys ₄) ₂ 2Zn 位点	螺旋-环-螺旋		GR	CXXG-X ₇ H-X ₉ -CXXG X ₁₁ H-X ₃ G-X ₅ G-X ₉ -CXXG-X ₄ C CX ₂ G-X ₂₄ -CX ₂ G
锌带	ZnCys ₄ 1Zn 位点	三条反平行β折叠		TFIS	
锌簇	Zn ₂ Cys ₆ 2Zn 位点	螺旋-伸展链-环 -螺旋-伸展链	5'-CGGN ₁₁ CCG-3'	GAL ₄	CXXG-X ₆ G-X ₆ - CXXG-X ₆ -C
其它	ZnCys ₃ His	Zn-S (N) 配合物 稳定蛋白质二聚体	结合单链 DNA	g ³² P	CXXG-X ₅ -CXXG

心脏发育是一个相当复杂的过程,每部分结构的形成和正常发育都需要特定基因的精确表达,发育过程受到大量锌指蛋白的调控,主要有 GATA, FOG, RXR 和 HF-1b 等,它们一般通过与 DNA 序列的结合来调节基因表达。

锌指蛋白转录因子 GATA 家族在心脏发育过程中起重要的作用,该家族有 6 个成员,均在特定

的组织中表达并对组织分化中起重要作用。所有的 GATA 蛋白都含有保守的 Cys₅-X₂-Cys₈-X₁₇-Cys₈-X₂-Cys₅ 锌指 DNA 结合结构域,能够识别相同元件 (A/T)GATA (A/T)。GATA-1, GATA-2 和 GATA-3 对造血组织发育很重要,而 GATA-4, -5, -6 对于大量心脏基因表达的直接调节非常重要,并且在胚胎发育以及心血管疾病中也很重要。

GATA-4, *GATA-5* 和 *GATA-6* 只在心脏、肝、肺等器官的中胚层和内胚层细胞中表达, 它们的作用可以通过 *GATA* 敲除的小鼠来进行分析. 通过同源重组产生 *GATA-4*, *-5*, *-6* 的突变等位基因, 从而从小鼠的表型分析 *GATA* 在心脏形成过程中的作用. 敲除 *GATA-4* 会造成早期胚胎发育内胚层的缺陷进而可能导致心脏缺陷. 研究发现 *GATA-4*^{-/-} 胚胎干细胞能够分化成嵌合体小鼠胚胎的心脏, 但这些细胞是否能够正常分化或是否具有正常功能还不清楚. 近来还发现 8p23.1 染色体上一段含有 *GATA-4* 基因的染色体缺失与先天性心脏缺陷密切相关, 这进一步论证了 *GATA-4* 在心脏形态建成中的重要作用^[4]. 敲除 *GATA-6* 会导致胚胎致死, 由于内脏的内胚层缺陷等胚外缺陷, *GATA-6* 缺失的小鼠在胚胎期 5.5 到 7.5 d 期间就会死亡. 抑制心肌细胞中的 *GATA-4* 和 *GATA-6* 会下调许多心脏表达基因, 包括 *ANP*, *BNP*, *cTnI*, α -*MHC* 和 β -*MHC* 等^[5]. 敲除 *GATA-5* 的小鼠存活至成年期的报道只有一例, 表型为尿殖道异常的雌鼠^[6]. 由于通常缺失 *GATA-5* 的小鼠缺失心脏, 所以妨碍了分析它在心脏发育中的作用. 斑马鱼中, *GATA-5* 错义突变能引起心脏二分叉, 影响心脏的分化. *GATA-5* 突变的鱼中, 心肌前体减少且一些心脏特异基因(如 *Nkx 2.5* 等)表达减少, 而 *GATA-5* 的过量表达会诱导 *Nkx 2.5* 的异位表达^[7]. 这些发现表明 *GATA-5* 在心脏特异基因调节和胚胎心脏图式发育中有重要作用.

GATA 因子还能够与其他转录因子相互作用形成联合复合物从而共同影响转录, 例如多类型的锌指蛋白转录因子 *FOG*. *FOG-1* 可通过它的一些锌指结构与 *GATA-1* 相互作用共同调节造血细胞发育, 但 *FOG-1* 不在心脏内表达, 通常只被当作 *GATA-1-3* 的辅因子. 与 *FOG-1* 不同, *FOG-2* 可在发育的心脏中表达, 并能与 *GATA-4*, *-5*, *-6* 相互作用^[8]. 两组有关 *FOG-2* 敲除小鼠的研究报道表明, *FOG-2* 缺失导致心脏发育异常, 会造成心室和心房间隔缺损并伴随冠状动脉血管的缺失, 通常小鼠在胚胎期约 13 d 左右就会死亡^[9, 10]. 这表明 *FOG-2* 对于正常的心脏形态建成很重要, 并为心脏三尖瓣形成所必需.

类固醇激素受体如甲状腺激素受体和视黄酸受体(*RAR*) 等也参与心脏发育的调节, 它们受到激素结合的调节并通过它们的锌指元件和 DNA 结合从而影响转录. 类固醇激素受体家族中与心

脏发育有关的因子大多与 *RXR*s 相关. 3 类视黄 X 受体 *RXR- α* , *RXR- β* 和 *RXR- γ* 分别在小鼠中敲除可观察到不同的表型. 敲除 *RXR- γ* 的突变小鼠能够存活, 可育且形态正常. 敲除 *RXR- β* 能够存活但是雄性不育. 而敲除 *RXR- α* 的突变小鼠在胚胎期约 13.5 d 左右会由于心脏发育不正常死亡, 这是由于心室壁变薄导致了心脏衰竭^[11]. 这些实验表明 *RXR* 受体是正常心脏发育的重要调控组分, 而 *RXR- α* 可能是心室心肌细胞分化的抑制因子或心肌细胞增殖的调节因子.

另外, 锌指蛋白转录因子 *HF-1b* 在心脏传导系统发生中起决定性作用. *HF-1b* 蛋白能够结合到 *MLG-2v* 启动子的 *HF-1b/MEF-2V* 位点, 起转录激活剂作用^[12]. 缺失 *HF-1b* 的小鼠心脏传导系统功能不正常, 可能存在窦房结, 房室结和传导系统的某些缺陷, 经常会在成年期突然死亡^[13]. 这表明 *HF-1b* 在心脏房室特异分化和心脏传导系统的转分化中有重要作用, 不过其作用的靶位点及调控路径还有待进一步证明.

上述几类锌指蛋白在心脏发育过程中有重要调节作用. 锌指蛋白与 DNA 的作用机制还没有完全揭示出来, 但一般认为它们的基因调节功能的作用机制是通过识别并结合于某基因上特定的 DNA 序列, 启动或激活该基因的转录而实现的. 也有观点认为锌指蛋白是以脱锌的形式夺取结合于 DNA 特定结构域的 Zn^{2+} 离子, 并结合于该部位, 从而引起 DNA 构型变化及激活基因的转录. 目前尚无确凿的证据证明何种结合机理正确, 但有一点是大家公认的, 即大多数锌指蛋白是通过与 DNA 结合来发挥其生物功能的, 含有锌指元件的蛋白都会以一种序列特异性的方式与 DNA 相互作用.

通常情况下锌指与 DNA 作用是通过 α 螺旋伸入 DNA 的大槽实现的. 其 α 螺旋以外的其它部分氨基酸序列与 DNA 磷酸骨架的接触, 锌指的 linker 序列以及 DNA 的结构(尤其是局部构象, 如扭曲等), 都与识别作用有关. 序列依赖的 DNA 构象对特异性识别有影响, 尤其是对于两者结合的亲合力具有较大的贡献. 有时锌指蛋白与 DNA 的结合, 会明显改变 DNA 的结构, 使之发生一定的弯曲, 这样, 大槽变得更适于锌指的结合. 连接相邻锌指的 linker 对于识别特异性虽然贡献不大, 但是由于它具有很好的可变性、柔韧性, 在使单独锌指以正确的取向与 DNA 的大槽结合以及保持

一个完整、合适的包装间隔上发挥了作用。

在一个多指蛋白中, 单个锌指的识别特异性可能还受其所在位置的影响。而同一锌指内部, 氨基酸之间的作用可能也会间接地影响氨基酸—碱基间的特异性的识别。另外, 即便对于同一个蛋白, 在其识别位点中不同碱基对于特异性识别的影响也不同。而且, 锌指蛋白具有相当的可塑性。同一个锌指蛋白可识别一套不同的、相关的 DNA 序列, 但锌指蛋白对特定顺式调节性 DNA 元件序列的改变却具有相当的稳定性; 不同的锌指又可识别同一序列, 但亲和性不同^[14]。此外, 锌指蛋白中锌的地位是不可替代的, 只有锌指蛋白才具有选择结合核酸的能力, 脱锌或用 Fe、Cu、Mn、Co、Ni 等金属离子置换锌离子都将可能导致锌指蛋白丧失其功能。这可能与锌在生物条件下缺乏氧化还原性有关, 二价锌离子是一种临界路易斯酸, 对于柔性蛋白质配体(如 Cys)和刚性蛋白质配体(如 Glu, Asp)的喜好区别很小, 并且它在配体数目和种类方面都具有灵活性。总的来讲, 有关锌指蛋白的作用机制虽然进行了相当深入的研究, 但是还是有许多问题没有得到解决。例如锌指的核酸识别特异性总是涉及特异性和亲和性两方面, 而目前的研究工作还仅仅集中在特异性方面, 对亲和性研究甚少, 但事实上只有特异性和亲和性之间达到一种平衡, 锌指蛋白才能够在体内有效发挥作用。此外, 锌指与 DNA 结合的动态变化过程以及作用特点等等都有待于进一步研究。

目前, 锌指蛋白研究主要集中在进一步发现新的锌指蛋白, 搜寻新的锌指基因, 以及进一步了解锌指与 DNA 相互作用机制等几个方面。有关研究发展很快, 我们心脏发育研究中心现已在人体基因中发现了许多新的锌指转录因子, 如 ZNF382, ZNF359, ZNF28 等等^[15, 16]。这些锌指基因在小鼠或果蝇等模式动物中的同源基因都与心脏发育相关, 我们研究中心正在阐明它们与人类心脏发育的关系。可以预见, 随着这些研究的深入, 锌指蛋白家族的成员会进一步扩大, 对它们的调控机制的认识也会进一步加强, 这将为我们的深入了解生物体中转录翻译等重要生物功能提供广阔的前景。

参考文献 (References):

[1] HENIKOFF S, GREENE E A, PIETROKOVSKI S, *et al.* Gene

- families: the taxonomy of protein in paralogs and chimeras [J]. Science, 1997, 278 (5338): 60.
- [2] DEAN E Wilcox, AUSTIN D Schenk, BRIAN M Feldman, *et al.* Oxidation of zinc-binding cysteine residues in transcription factor proteins [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2001, 3(4): 549-563.
- [3] 黄仲贤, 顾伟强, 胡红雨. 锌指类基因调控蛋白—生物无机化学和分子生物学发展的新领域 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(3): 208-213.
- [4] BHATIA S N, SURIV, BUNDY A, *et al.* Prenatal detection and mapping of a distal 8p deletion associated with congenital heart disease [J]. Prenatal Diag, 1999, 19: 862-867.
- [5] CHARRON F, PARADIS P, BRONCHAIN O, *et al.* Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 4355-4365.
- [6] MOKKENTIN J D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5 and -6 ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 38949-38952.
- [7] REITER J F, ALEXANDER J, RODAWAY A, *et al.* Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish [J]. Genes Dev, 1999, 13: 2983-2995.
- [8] HOLMES M, TURNER J, FOX A, *et al.* hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the corepressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 23491-23498.
- [9] SVENSSON E C, HUGGINS G S, LIN H, *et al.* A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2 [J]. Nature Genet, 2000, 25: 353-356.
- [10] TEVOSIAN S G, DECONINCK A E, TANAKA M, *et al.* FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium [J]. Cell, 2000, 101: 729-739.
- [11] MARK M, KASTNER P, GHYSELINCK N B, *et al.* Genetic control of the development by retinoic acid [J]. Comptes Rendus Seances Soc Biol Ses Filiales, 1997, 191: 77-90.
- [12] ZHU H, NGUYEN V T, BROWN A B, *et al.* A novel, tissue-restricted zinc finger protein (*HF-1b*) binds to the cardiac regulatory element (*HF-1b*/MEF-2) in the rat myosin light-chain 2 gene [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13: 4432-4444.
- [13] NGUYEN-TRAN V T, KUBALAK S W, MINAMISAWA S, *et al.* A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages [J]. Cell, 2000, 102, 671-682.
- [14] 赵志虎, 马清钧. 锌指结构: 最普遍的核酸识别元件 [J]. 生物技术通讯, 2001, 12(1): 36-41.
- [15] LUO Kai-mei, YUAN Wei-zhou, WU Xi-shan, *et al.* Expression of a novel Krüppel-like zinc-finger gene, ZNF382, in human heart [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 299, 606-612.
- [16] ZHOU Liang, ZHU Chuan-bing, LIU Ming-yao, *et al.* Identification and characterization of two novel zinc finger genes, ZNF359 and ZNF28, in human development [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 295, 862-868.