

# 细菌 ADP-核糖基水解酶的结构基础与催化机理

焦引弟<sup>1</sup>, 张路豪<sup>2</sup>, 欧阳松应<sup>1,3</sup>, 关洪鑫<sup>1\*</sup>

1 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350117

2 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350117

3 福建师范大学, 南方生物医学研究中心, 福建 福州 350117

焦引弟, 张路豪, 欧阳松应, 关洪鑫. 细菌 ADP-核糖基水解酶的结构基础与催化机理[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 38-51.  
JIAO Yindi, ZHANG Luhao, OUYANG Songying, GUAN Hongxin. Structural basis and catalytic mechanism of bacterial ADP-ribosyl hydrolases[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(1): 38-51.

**摘要:** ADP-核糖基化(adenosine diphosphate-ribosylation, ADPr)修饰是由 ADP-核糖基转移酶(adenosine diphosphate-ribosyltransferases, ARTs)和 ADP-核糖基水解酶(adenosine diphosphate-ribosylhydrolases, ARHs)共同催化的可逆化翻译后修饰, 广泛地分布于真核生物和原核生物中。ARHs 是一类能够逆转特定氨基酸残基或 DNA、RNA 特定位点/序列 ADPr 修饰的关键酶, 通过调控细菌或宿主的生理代谢、信号传导和基因表达调控等关键生命过程, 在细菌物种间/种内的竞争、应激反应和致病性中发挥重要作用。鉴于细菌 ARHs 相关研究领域近期取得了一定的进展, 本综述从其分类、结构特点以及催化机制角度对其进行系统总结, 以期为深入理解细菌 ARHs 的作用机理及其在细菌生命过程的重要生物学功能提供帮助。

**关键词:** ADP-核糖基水解酶; 结构基础; 催化机理

## Structural basis and catalytic mechanism of bacterial ADP-ribosyl hydrolases

JIAO Yindi<sup>1</sup>, ZHANG Luhao<sup>2</sup>, OUYANG Songying<sup>1,3</sup>, GUAN Hongxin<sup>1\*</sup>

1 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, Fujian, China

2 College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350117, Fujian, China

3 FJNU Biomedical Research Center of South China, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, Fujian, China

**Abstract:** Adenosine diphosphate-ribosylation (ADPr) is a reversible post-translational

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

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82225028, 82172287, 31900879, 32171265) and the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301403).

\*Corresponding author. E-mail: [guanhongxin@fjnu.edu.cn](mailto:guanhongxin@fjnu.edu.cn)

Received: 2024-08-19; Accepted: 2024-10-14; Published online: 2024-10-15

modification that is catalyzed by adenosine diphosphate-ribosyltransferases (ARTs) and adenosine diphosphate-ribosylhydrolases (ARHs), and it widely occurs in eukaryotes and prokaryotes. ARHs are a class of key enzymes that can reverse ADPr modification of specific amino acid residues or specific sites/sequences of DNA and RNA. They can regulate the physiological metabolism, signal transduction, gene expression, and other key life processes in bacteria or hosts, playing an important role in the inter/intraspecific competition, stress responses, and pathogenicity of bacteria. This article reviews the classification, structural characteristics, and catalytic mechanisms of bacterial ARHs, aiming to enrich our understanding about the catalytic mechanisms and biological functions of ARHs in bacterial life.

**Keywords:** ADP-ribosylhydrolases; structural basis; catalytic mechanism

ADP-核糖基化 (adenosine diphosphate-ribosylation, ADPr) 修饰是一种普遍存在于原核和真核生物中的蛋白质翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs), 广泛参与 DNA 损伤修复、细胞应激、衰老过程、肿瘤代谢、信号转导和病原体感染等重要的生命过程<sup>[1-2]</sup>。该修饰是一种复杂的动态可逆化 PTM, 依赖于 ADP-核糖基转移酶 (adenosine diphosphate-ribosyltransferases, ARTs) 和宏结构域 (macrodomain) 蛋白家族或 ADP-核糖基水解酶 (adenosine diphosphate-ribosylhydrolases, ARHs), 共同完成对蛋白、核酸或其他小分子的修饰及去修饰过程<sup>[1-3]</sup>。在此过程中, ARTs 将  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 水解成 ADPr 和烟酰胺 (nicotinamide, NAM), 然后将 ADPr 以 O-糖苷键、N-糖苷键或 S-糖苷键的方式与氨基酸侧链、核酸或其他代谢产物的核糖相连, 完成 ADPr 修饰; 该修饰可以分为聚 ADPr 修饰和单 ADPr 修饰 2 种形式, 细菌中主要以单 ADPr 修饰为主, 并在细菌物种间/种内的竞争、应激反应和致病性中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。ADPr 连接的形式、长度和复杂性可以显著影响 PTMs 的半衰期、下游事件发生的顺序, 以及逆转它所需的酶<sup>[5]</sup>。负责水解 ADPr 修饰的蛋白在进化上主要分为

Macrodomain 家族和 ADPr 水解酶家族 2 个家族<sup>[4]</sup>。前者既可以单独识别 ADPr 基因/链, 也可以将其水解, 在真核生物中可以分为 MacroD 样水解酶 (包括 MacroD1 和 MacroD2 两个分支)、ALC1 样水解酶 (hTARG1) 以及聚 ADPr 水解酶 (poly ADP-ribosyl glycohydrolases, PARGs) 样水解酶 (hPARGs)<sup>[6]</sup>; PARGs 在真核生物中又可以分为 ARH1、ARH2 和 ARH3 三个分支。在细菌中也广泛存在着这两大类可以水解 ADPr 基因/链的水解酶<sup>[4,6-7]</sup>。

近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 对细菌 ARHs 的研究也逐渐深入, 越来越多研究表明, 由其参与的 ADPr 修饰在细菌种间竞争、响应外界环境刺激和 DNA 损伤、生物膜形成、抗生素代谢调节、氧化应激防御以及致病过程中发挥重要作用<sup>[8-11]</sup>。因此, 本文系统地总结了近期细菌 ARHs 的研究进展, 以期对相关领域的研究提供参考。

## 1 细菌 ARHs 的分类

ADPr 修饰作为一个动态过程, 其 ADPr 的催化连接和清除之间保持动态平衡, 这种平衡对于细菌内实现该反应可逆性和 ADPr 底物循环利用至关重要<sup>[1]</sup>。细菌 ARHs 由 Macrodomain 家族和 dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) 家族 2 种进化和结构上不同的家族组成<sup>[4]</sup>。

Macrodomain 家族 ARHs 具有保守的核心结构域, 由  $\alpha$  螺旋- $\beta$  折叠- $\alpha$  螺旋构成“三明治”样结构, 中间部分的 7 个  $\beta$  折叠形成  $\beta$  片层结构被 5 个  $\alpha$  螺旋包围, 并形成“催化口袋”以结合 ADPr 基团<sup>[6]</sup>。其中 ADPr 的腺苷部分与保守的芳香族氨基酸通过  $\pi$ - $\pi$  堆积相互作用, 并且芳香族氨基酸残基的第 6 位氮原子还会与天冬氨酸残基形成配位键<sup>[12]</sup>; “催化口袋”区域相关氨基酸通过其侧链/主链与焦磷酸形成氢键网络来稳定 ADPr 的结合<sup>[13]</sup>。Macrodomain 家族蛋白都具备一个保守的  $\alpha$  螺旋-loop 结构, 该结构参与构成“催化口袋”, 许多该家族蛋白参与构成催化中心的关键氨基酸也都位于其上; 此外, 该结构还通过与 ADPr 远端核糖基团及水分子形成氢键网络, 共同维持 ADPr 处于合适的催化位置和角度, 为下一步催化反应的发生提供条件<sup>[12]</sup>。细菌 Macrodomain 家族 ARHs 主要包括 MacroD 样 ADPr 水解酶、PARG、amplified in liver cancer 1 (ALC1) 样 ADPr 水解酶, 其中后者又可以分为 terminal ADPr glycohydrolase 1 (TARG1) 样 ADPr 水解酶和 TARG1、DarG 样 ADPr 水解酶, 以及 SCO6735 样 ADPr 水解酶<sup>[6,14]</sup>。除此之外, 近期在嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*) 中也新报道了 Larg1<sup>[15]</sup> 和 MavL<sup>[16]</sup> 2 个具有 ADPr 水解酶活性的效应蛋白, 它们具有 Macrodomain 家族的经典结构域, 但关键催化氨基酸和催化机制则具有独特特征。另一大类是 DraG 样 ARHs, 以固氮菌中首次发现的 DraG 命名, 主要由一个全部为  $\alpha$  螺旋组成的核心结构域构成, 其 N 端在不同的细菌中则存在明显不同, 通常分为 2 种结构: 约 12 个氨基酸组成的  $\alpha$  螺旋结构, 也被称为 N terminal helix (NTH) 和约 60 个氨基酸组成的  $\alpha$  螺旋-loop 结构, 称为

N terminal extension (NTE)<sup>[17-18]</sup>。该类 ARHs 与人类基因组中编码的 3 种 ARHs 具有相似的核心结构域(ARH1-3)<sup>[19]</sup>。此外, 在变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)和单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)中鉴定到的 type VI secretion ADP-ribosyltransferase immunity 1 (Tri1)<sup>[8]</sup>和 Esx secretion ADP-ribosyltransferase immunity 1 (Eri1)也属于该家族成员(表 1)。

## 2 细菌 ARHs 的结构特点及催化机制

ARHs 对底物具有专一性, 能高效识别并水解特定定位点的 ADPr 修饰; 与真核生物中的 PARGs 类似, 细菌中的 PARGs 也能水解聚 ADPr (poly ADP-ribose, PAR)中重复的糖苷核糖-核糖键, 将 PAR 聚合物链切割成单个 ADPr, 但其对短 PAR 聚合物上的加工能力有限, 并且不能够清除单 ADPr 修饰<sup>[36-38]</sup>。MacroD1、MacroD2 和 TARG1 则可以水解天冬氨酸、谷氨酸和 O-酰基-ADPr (O-acyl-ADP-ribose, OAADPr) 的 O-糖苷键, 催化末端 ADPr 核糖部分的切割<sup>[6]</sup>。DarG 可特异性水解 DNA 单链上胸腺嘧啶或者鸟嘌呤上的 ADPr 基团<sup>[39-40]</sup>。嗜肺军团菌的效应蛋白 MavL 和 Larg1 可以特异性的切除蛋白质精氨酸的单 ADPr 基团, 从而恢复靶蛋白的功能<sup>[15-16]</sup>。此外, 细菌 DraG 样 ARHs, 如 DraG、Tri1 和 Eri1 同样可以特异性的将底物蛋白精氨酸上的 ADPr 基团切除, 从而逆转其对应的 ARTs 的修饰, 并恢复底物蛋白的活性<sup>[8,17]</sup>。

### 2.1 Macrodomain 家族

#### 2.1.1 MacroD 样 ARHs

MacroD 样 ARHs 普遍存在于各种生命体中, 如人类中的 MacroD1, 也被称为白血病相关蛋白 16 (leukaemia-related protein 16, LPR16) 和 MacroD2<sup>[41-42]</sup>; 布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*

表 1 细菌 ADP-核糖基水解酶分类、底物及催化基序

Table 1 Classification, substrates, and motifs of ADP-ribosylhydrolases

Classification	ARHs	PDB/UniProt	Substrates	Motif/Catalytic aa	References
Macrodomain family	MacroD-like				
	YmdB	5CB3	OAADPr Protein-ADPr	<u>NAAN</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> ----- <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u>	[10]
	OiMacroD	5L9Q	OAADPr Protein-ADPr	<u>NAAN</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> ----- <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>G</u>	[20]
	SAV0325	5KIV	-	-	[11]
	SCO6450	Q9ZBG3	Protein-ADPr ADPr-5'P-dsDNA dsDNA-3'P-ADPr ADPr-5'P-RNA	<u>NAAN</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>H</u> ----- <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>R</u>	[21-24]
	PARGs				
	TCPARG	3SIG	Protein-PAR	<u>ASA</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>S</u>	[25]
	DrPARG	5ZDB	Protein-PAR	<u>ASA</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>S</u>	[26]
	ALC1-like				
	FmTARG1	C3WDV1	OAADPr Protein-ADPr Protein-PAR	<u>F</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>W</u> ----- <u>M</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u>	[27]
	DarG*	5M3E	ssDNA-T-ADPr	<u>F</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>R</u> ----- <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>W</u>	[9,28-30]
	SCO6735	5E3B	Protein-ADPr	-	[31]
	Others				
	Larg1*	7W3S	ANTs-ADPr	<u>P</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>S</u>	[15,32-33]
	MavL*	8IPW	ADPr-Ub	<u>A</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u>	[16,34-35]
DraG family	DraG	2WOE	Protein-R-ADPr	<u>A</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>K</u> ----- <u>Q</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>M</u> ----- <u>P</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>N</u>	[17]
	Tril*	6DRE	Protein-R-ADPr	<u>T</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>R</u> ----- <u>R</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>T</u> ----- <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u>	[8]

PDB: Protein Date Bank; 下划线标注: 关键氨基酸催化残基; \*: 2016 年后文献报道; -: 暂无文献报道。

PDB refers to Protein Date Bank; Underline refers to the key catalytic residues; \* refers to the literature report after 2016; - means no literature report.

*gambiense*)中的 *Trypanosoma brucei* MacroD-like protein (TbMDO); 病毒中, 如冠状病毒科 (Coronaviridae)、披膜病毒科 (Togaviridae) 和肝病病毒科 (Hepeviridae) 中的非结构蛋白 nsp3 (non-structural protein 3, nsp3)<sup>[43-45]</sup>, 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的 YmdB<sup>[10]</sup> 和伊平海脊大洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus iheyensis*) 中的 OiMacroD<sup>[20]</sup>。它们都是单 ADPr 水解酶, 不仅对蛋白质底物中酸性氨基酸的 ADPr 修饰具有酶切活性, 还可以水解 Sirtuins 脱乙酰基反应过程中产生的 OAADPr, 并进一步通过去乙酰化反应将其水解为游离的乙酸和 ADPr<sup>[46]</sup>。

通常情况下, MacroD 样 ARHs 的催化反应需要天冬酰胺( $\beta$ 3- $\alpha$ 1 环)、天冬氨酸( $\alpha$ 1 螺旋)和酪氨酸( $\beta$ 6- $\alpha$ 4 环) 3 个保守的氨基酸<sup>[47]</sup>。对于 OiMacroD, 对应的 3 个氨基酸分别为 N30、D40 和 Y134。其中 N30 ( $\beta$ 3- $\alpha$ 1 环)主要负责结合并稳定亲核水分子, Y134 ( $\beta$ 6- $\alpha$ 4 环)负责稳定远端核糖并使其处于正确的位置和方向, D40 (螺旋  $\alpha$ 1)激活负责亲核攻击的水分子并使其去质子化, 此外, N27 ( $\beta$ 3)和 H44 ( $\alpha$ 1)在协同 D40 激活水分子的去质子化过程中具有重要作用; 在底物识别并结合的过程中, 催化环  $\beta$ 6- $\alpha$ 4 会发生底物诱导的构象变化, “催化口袋”由“开

放”状态转变为“关闭”状态，这一构象变化导致催化环上的主链酰胺基团与 ADPr 焦磷酸基团相互作用并将其被封闭于“催化口袋”中，同时使 Y134 转向合适位置并参与远端的核糖基团的旋转和固定(图 1A)；D40 存在 2 种旋转异构体，I型 D40 旋转异构体可与远端核糖的 2'-OH 相互作用，在与特异性底物的结合和催化中发挥重要作用，EcYmdb (PDB: 5CB3)和 hMacroD2 (PDB: 41QY)中也存在这种 D40 旋转异构体<sup>[10,47]</sup>。II型 D40 旋转异构体则与 G36 的主链形成氢键，此种情况主要存在于未结合 ADPr 的 OiMacroD-MES (PDB: 5FUD)、N30A (PDB: 5LBP)突变体和 EcYmdb (PDB: 1SPV)结构中；D40A 的突变导致 D40 和 G36 间无法形成氢键，从而导致  $\beta$ 3- $\alpha$ 1 环产生 4 Å 的位移，占据远端核糖结合的位置，这也表明 D40 除了激活水分子参与亲和攻击，还参与维持  $\beta$ 3- $\alpha$ 1 环的合适构象，并为 ADPr 或 OAADPr 的结合提供合适的空间；除了这些关键氨基酸，还有 6 个水分子也参与了底物的结合及催化，其中 5 个水分子主要参与底物的结合，3 个负责腺苷的结合，2 个负责与焦磷酸结合，而最后 1 个水分子则主要参与催化，当其被 P $\alpha$  激活后，可以参与对核糖基部分 C1''的亲核攻击，最终催化 1'-OAADPr 的去乙酰化反应或者单 ADPr 修饰蛋白的 ADPr 水解反应<sup>[10,20]</sup>。

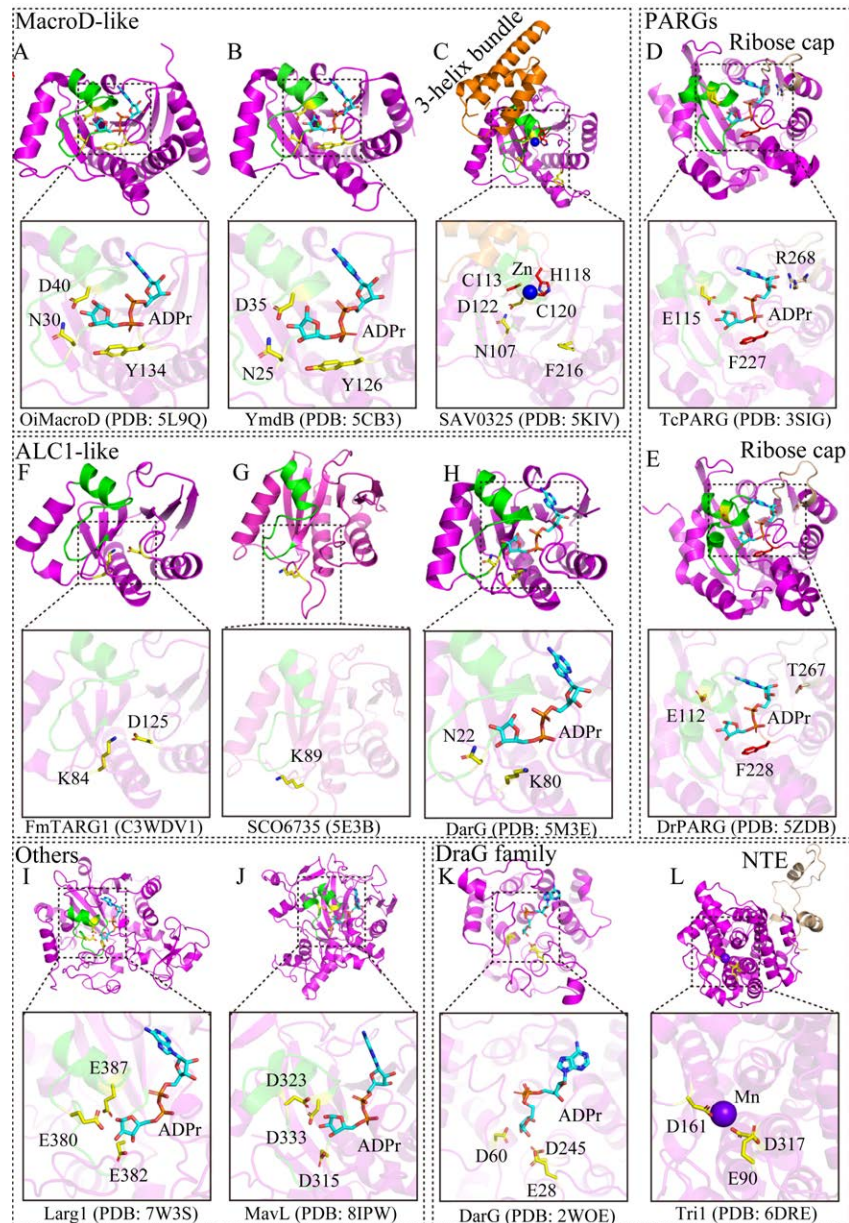
对于 YmdB，其 N25 和 D35 通过与 ADPr 远端核糖基团的 2'-OH 形成氢键，帮助 YmdB 选择性识别 2'-OAADPr 而非 3'-OAADPr 或 1'-OAADPr，Y126 则通过稳定远端核糖方向也在一定程度上为底物特异性识别提供帮助。G32 通过与 2'-OAADPr 乙酰基之间的氢键相互作用，协助催化反应的顺利进行<sup>[10,48]</sup> (图 1B)。

在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)等致病菌中存在一类特殊的 NAD<sup>+</sup>依赖的组蛋白去乙

酰化酶(sirtuins)，即 SirTM，它们在结构上与 Sir2 相似，但两者序列相似性只有 10.6%；这类 sirtuins 的操纵子中含有编码特定 MacroD 样 ARH 的基因，编码的 ARH 可逆转 sirtuins 催化的 ADPr 修饰，因此，被硫辛酸连接酶 A 硫辛酰化修饰的甘氨酸切割系统 H 蛋白的功能可通过 ADPr 可逆修饰进行动态调控，最终帮助病原菌应对宿主的氧化应激反应<sup>[46]</sup>。对来自金黄色葡萄球菌的 MacroD 样 ARH 即 SAV0325 的研究表明，尽管 Macrodomain 核心结构域的整体结构具有明显的保守性，但其包含一个独特的 C-H-C 型 Zn<sup>2+</sup>结合位点，该位点可能与 ADPr 的结合有关；此外，其 N 端则由 3 个额外的反向平行的  $\alpha$  螺旋束折叠组成，该折叠对 C-H-C 构象的稳定起了一定的支撑作用(图 1C)；SAV0325 还具有一个具有明显的疏水腔，该腔可能通过结合硫辛酰化底物蛋白的硫辛酸基团来识别并结合底物，这也为下一步的 ADPr 切除提供了基础<sup>[11,31]</sup>。

### 2.1.2 PARGs 类 ARHs

PAR 修饰作为一种重要的 PTM，在维持细胞基因组稳定性，如 DNA 修复、染色质结构维持、有丝分裂和细胞凋亡等方面发挥重要作用<sup>[25,49]</sup>。尽管之前学界认为原核生物缺乏 PAR 代谢，但是随后在一些细菌中的确发现了与真核生物 PAPR1 同源的 PARPs，以及可能催化去 PAR 修饰的蛋白(由 DUF2263 基因编码)<sup>[25,50]</sup>。2011 年，Slade 等<sup>[25]</sup>以弯曲高温单孢菌(*Thermomonospora curvata*)中 DUF2263 基因编码的蛋白(命名为 TcPARG)为研究对象，确认了该蛋白的确具有去 PAR 酶活，这也是首次在细菌中确认存在 PARG；此后 Cho 等<sup>[26]</sup>又在耐辐射奇异球菌(*Deinococcus radiodurans*)中发现了另外一个 PARG，命名为 DcPARG。DcPARG 基因的敲除可以导致接收辐射照射的耐辐射球菌中积累 PAR，进一步表明，细菌中的确存在 PAR 代谢<sup>[26]</sup>。



**图 1** 不同细菌 ARHs 的结构、催化核心结构域和催化基序。ARHs 核心结构域用洋红色飘带方式显示，其他特殊结构部分：SAV0325 的 N 端 3-helix bundle 区域用橙色显示；TcPARG 和 DrPARG 的“核糖帽”结构以及 Tri1 的 NTE 结构部分都用麦黄色显示。涉及催化反应的关键氨基酸用黄色棍棒模型显示，ADPr 用青色棍棒模型显示， $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  分别用蓝色和紫色球体显示。A–J：Macrodomain 家族 ARHs，其中 A–C 图为 MacroD 样 ARHs，D 和 E 图为 PARGs，F–H 图为 ALC1 样 ARHs，I 和 J 图分别为嗜肺军团菌中新报道的 Macrodomain 家族 ARHs，Larg1 和 MavL；K–L：DraG 家族 ARHs、DraG 和 Tri1。

**Figure 1** Structure, core domains, and catalytic motifs of different bacterial ARHs. The core domain of ARHs is shown as a cartoon in magenta, and the N-terminal 3-helical bundle region of SAV0325 is shown as a cartoon in orange. The “ribose cap” of TcPARG and DrPARG as well as the NTE of Tri1 are shown in wheat. Key residues involved in the catalytic reaction are shown as sticks in yellow, ADPr as sticks in cyan, and  $Zn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  as spheres in blue and purple, respectively. A–J show Macrodomain family ARHs. A–C: MacroD-like ARHs; D, E: PARGs; F–H: ALC1-like ARHs; I, J: newly reported Macrodomain family ARHs in *Legionella pneumophila*, Larg1, and MavL, respectively. K–L: DraG family ARHs, DraG, and Tri1.

典型的真核生物如人的 PARGs, 除了 C 末端负责催化的 Macrodomain 外, 还包括 N 端调节结构域(regulatory and targeting domain, RT-domain) 和中间附属结构域(accessory domain, AD)<sup>[25]</sup>。与经典的真核生物 PARGs 不同, TcPARG 只包含一个典型的 Macrodomain 结构, 但它们的 ADPr 结合“口袋”都位于  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠形成的裂隙中, 主要由位于一侧的二磷酸结合环和另一侧的催化螺旋-环构成; 其中催化螺旋-环结构在 PARGs 中具有明显的序列同源性, 主要由 GGG-X<sub>6-8</sub>-QEE 模序构成, 它们在结构上也具有明显的相似性; TcPARG 的结构生物学研究表明, 在结合 ADPr 的过程中, 其构象发生了一定变化, 其中 V226 和 F227 会轻微重排, 使 F227 侧链与 ADPr 的核糖部分能够紧密接触, 以保证 ADPr 处于“催化口袋”中合适位置, 然而由于 C 末端“核糖帽”这一特殊结构的存在, 尤其是一个芳香族氨基酸(W260)的存在, 空间位阻导致其“催化口袋”中结合的 ADPr 只能是 PAR 长链中最末端的一个, 并决定 TcPARG 是一个核糖外切酶(图 1D); 这与在真核生物 PARGs 的现象相同, 例如 hPARG 中该氨基酸为 F902, 它的存在导致 hPARG 对 PAR 聚合链内糖苷键的结合能力较低, 使其主要发挥核糖外切酶活性<sup>[51]</sup>。尽管 TcPARG 只有聚 ADP-核糖外切酶活性, 但是其催化机制与经典的 PARGs 高度相似, 都是由谷氨酸(E115)和水分子共同介导亲核攻击以断裂糖苷键<sup>[25,38,52]</sup>。

相比于普通细菌, 耐辐射球菌具有更强 DNA 辐射损伤修复能力, 转录组学分析表明, 其遭遇辐射后 DrPARG 的表达水平明显上调, 暗示 DrPARG 可能参与 DNA 损伤修复, 这也与之前报道的 ADPr 修饰参与真核细胞 DNA 损伤修复的研究相契合; 结构生物学研究表明, DrPARG 在空间结构上也是一个典型的

Macrodomain 折叠, 并且具备典型的螺旋-环催化基序(-G<sub>100</sub>GGFLGGGAQAQEE<sub>112</sub>-); 在催化的过程中, DrPARG 的“催化口袋”也需要经历一定的构象变化以更好地结合 ADPr, 并且结合方式和催化糖苷键断裂的机制与先前报道的细菌 TcPARG 以及经典的真核生物 PARGs 高度相似; 与 TcPARG 不同的是, DrPARG 的 N 端具有更高的柔性, 并进一步为其催化环提供更高的可变性; 此外, 其催化环上的 D113 (TcPARG 中为 G116)可与 ADPr 基团的碱基部分形成氢键以更好地结合并稳定 ADPr, 尽管都具有“核糖帽”结构, DrPARG 在该区域的第 267 位氨基酸为苏氨酸(T267), 而 TcPARG 在该位置则为具有大侧链且带正电荷的精氨酸(R268), “核糖帽”上这一精细差别也导致 DrPARG “催化口袋”中结合核糖 2'-OH 的位置具有足以允许一个水分子进入的空间, 从而为聚 PAR 的 n+1 位 ADPr 的结合提供空间; 此外, “核糖帽”上的第 259 位氨基酸为亮氨酸(L259), 相比于 HsPARG 和 TcPARG 的芳香族氨基酸 F 和 W, 具有更小的侧链基团, 从而减少 PAR 聚合链结合的空间位阻(图 1E)<sup>[25-26,53]</sup>。总之, DrPARG 催化环的结构柔性和“核糖帽”关键氨基酸的差异共同决定了其还具备核糖内切酶活性, 这也为 ADPr 修饰在 DNA 损伤修复中提供了重要的结构基础<sup>[26,54]</sup>。

### 2.1.3 ALC1 样 ARHs

Ahel 等<sup>[55]</sup>基于生物信息学分析发现, 细菌 ALC1 样 ARHs 从进化上主要包括 3 个分支: TARG1 样 ARHs、SCO6735 样 ARHs 和 DarG 样 ARHs。TARG1 样 ARHs 分布并不广泛, 只占 Macrodomain 家族蛋白的 1%, 在搜索到的 262 个 TARG1-like ARHs 中, 只有 13%来自细菌, 并且主要存在于厚壁菌门(*Firmicutes*)和梭菌门(*Fusobacteria*)中; 其中死亡梭杆菌(*Fusobacterium mortiferum*) ATCC 9817 是唯一

一种对人类致病的细菌, 其 TARG1 被命名为 FmTARG1; 酶活力测定表明, FmTARG1 同样具备 hTARG1 的 3 种酶活, 且酶活更高, 不仅可以催化水解 OAADPr, 还可以催化切除/水解单 ADPr 和 PAR 基团; 目前 FmTARG1 的结构尚未报道, 其详细的催化机制也未完全阐明; 根据 AlphaFold3 预测的结构显示, FmTARG1 与 TARG1 的 RMSD 为 0.635 Å, 其中可能负责催化反应的 2 个关键氨基酸分别为 K73 和 D115 (TARG1 中对应为 K84 和 D125), 二者具有高度相似的催化机制, 即 K73/K84 对核糖基团的 C' 进行亲核攻击形成临时的 K84-ADPr 中间产物, 从而释放底物蛋白被修饰的谷氨酸, D115/D125 则进一步通过水解席夫碱并释放 ADPr 产物<sup>[27]</sup> (图 1F)。此外, 在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中也鉴定到了一个 ALC1 样蛋白——SCO6735, 一级序列及高级结构比对显示, SCO6735 并不存在 TARG1 样蛋白的 2 个关键催化氨基酸, 但却可以在体外反应中切除谷氨酸残基上的单 ADPr 修饰, 由于目前 SCO6735 与 ADPr 或其修饰底物的复合物结构尚未解析, 其具体催化机制尚不清楚(图 1G); SCO6735 的表达受 RecA 非依赖性 DNA 损伤诱导启动子的控制, 并在紫外诱导的 DNA 损伤时上调表达, 因此推测 SCO6735 可能参与 DNA 损伤修复<sup>[56]</sup>。此外, SCO6735 的破坏会增加放线菌素抗生素的产生, 这表明其可能在抗生素代谢中也具有调节作用<sup>[31,57]</sup>。

DarG 样 ARHs 是近些年报道的一类独特的 ARH, 它修饰的底物不是蛋白质, 而是 DNA, 并且广泛地分布于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)和条件致病菌门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)等致病菌, 以及一些非致病菌如水生栖热菌(*Thermus aquaticus*,

Taq)中<sup>[9]</sup>。DarG 与 DarT 共同组成毒素-抗毒素 (toxin-antitoxin, TA) 系统, 并在染色体复制的初期通过 ADPr 修饰 DNA 调控细菌的生长<sup>[9,58-59]</sup>。其中 DarT 具有 ART 活性, 可以对 DNA 中的胸腺嘧啶或鸟嘌呤进行特异性修饰, 而 DarG 则具有 ARH 活性, 可以将 ADPr 基团从被修饰的胸腺嘧啶或鸟嘌呤上切除; MtbDarG 和 TaqDarG 的结构比对表明, 二者具有典型的 Macrodomain 家族蛋白的空间折叠, RMSD 高达 0.89 Å<sup>[9]</sup>, 并且与 TARG1 具有最高的结构相似性<sup>[60]</sup> (图 1H)。DarG 催化去 ADP-核糖基化修饰的关键氨基酸和催化机制与 TARG1 也相似, 例如, TaqDarG 的 K80 也通过亲核攻击与 ADPr 形成赖氨酰-ADPr 中间产物<sup>[9]</sup>。此外, DarG 可以与 RecA、RecB 和 RecF 等 DNA 修复因子相互作用, 表明这些蛋白质可以与 DarG 一起被募集到 DNA 的 ADPr 修饰位点, 介导 DNA 的损伤修复<sup>[61]</sup>。研究表明, DarTG TA 系统可能提高细菌对外界环境压力和抗生素影响的适应性, 这些因素可以刺激 DarT 的表达, 并进一步诱导细菌进入休眠状态, 当环境压力和抗生素浓度降低后, DarG 的分泌能有效帮助菌体恢复正常活性<sup>[28,62]</sup>。近期有报道表明, 该系统还参与了细菌的抗噬菌体反应, 并将该系统分为 DarTG1 和 DarTG2 两个进化分支<sup>[29-30]</sup>。在未感染噬菌体的情况下, DarG 结合并中和 DarT 的毒性保护细菌自身免受毒性杀伤, 而当 RB69 或 T5 噬菌体感染细菌后, 某些因素触发激活了该系统, 并释放 DarT1/2 毒素对噬菌体 DNA 进行 ADPr 修饰, 抑制其基因组的复制, 从而阻止成熟病毒的产生, 最终为细菌提供强有力的抗噬菌体能力<sup>[30]</sup>。

#### 2.1.4 Larg1

嗜肺军团菌效应蛋白 Lpg0081 (Larg1) 也是近期报道的一个 MacroD 样 ARH; 在嗜肺军团



菌感染宿主细胞的前期, ADP-核糖基转移酶 Lpg0080 (Ceg3)通过对线粒体上的腺苷酸转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)进行 ADPr 修饰,抑制 ANTs 对 ADP/ATP 的跨内膜运输,进而抑制宿主细胞线粒体的能量转运<sup>[32-33]</sup>。感染中后期, Larg1 通过其 ARH 活性将 ANTs 的 ADPr 基团切除,以恢复其 ADP/ATP 转运能力<sup>[32]</sup>。Larg1 的整体结构与其他典型的 Macrodomain 家族 ARHs 类似,由 9 个  $\beta$  折叠片和 6 个  $\alpha$  螺旋组成“三明治”样结构,其催化环位于“催化口袋”中,由 19 个残基(-S<sub>371</sub>DAFALTGNEWGYGS VES<sub>388</sub>-)组成,尽管该催化环的氨基酸序列与 Macrodomain 家族其他 ARHs 有较低的同源性,但可以形成特定的  $\alpha$  螺旋-环结构,位于该结构上的 D372-E380-E387 共同组成了 Larg1 的催化中心,其中 E380 负责攻击 ANT1 的 R236 和 ADPr 之间的 N-糖苷键,并最终催化其断裂;构成“催化口袋”的一些关键氨基酸通过氢键与 ADPr 基团的不同区域相互作用,进而将其固定在合适的催化位置,这些氨基酸突变后都会一定程度地影响 Larg1 的 ARH 活性,此外, Y134 和 F282 在“催化口袋”的上方形成一个“盖子”样结构,为稳定 ADPr 提供帮助(图 1I)<sup>[15]</sup>。

### 2.1.5 MavL

Lpg2526 (MavL)是最近报道的另外一个具有 ARH 活性的嗜肺军团菌效应蛋白<sup>[16]</sup>。在嗜肺军团菌感染的过程中, SidE 家族蛋白首先通过其 ART 结构域对泛素(ubiquitin, Ub)的 R42 进行 ADPr 修饰,然后通过其 PDE 结构域将 ADPr 基团转变成 PR 并连接到底物蛋白上,完成对底物蛋白的非经典泛素化修饰<sup>[34-35,63]</sup>。效应蛋白 DupA/DupB 通过去泛素化反应将 PR-Ub 从底物上切除,随后 Lpg2527 (LnaB)以 ATP 作为配体,在宿主肌动蛋白的激活下催化单磷酸腺苷酸化反应将游离的 PR-Ub 转化成 ADPr-Ub,

MavL 则进一步发挥 ARH 活性,将 ADPr 基团从 Ub 上切除,恢复 Ub 分子的“自由”,使其能够回归宿主的泛素化通路,继而解除 ADPr-Ub 和 PR-Ub 的宿主细胞毒性<sup>[35]</sup>。MavL、MavL-ADPr 和 MavL-Ub-ADPr 的相关结构都已经获得解析,结构分析表明, MavL 具备 Macrodomain 家族 ARHs 的核心结构和由螺旋-环构成的关键催化元件,其中 D315、D323 和 D333 共同组成了 MavL 的催化中心(图 1J);在识别底物(ADPr-Ub)的过程中, MavL 需要发生构象变化将其“催化口袋”打开,然后 Ub 的 R42 上修饰的 ADPr 插入该“催化口袋”中,并与周围氨基酸形成复杂的氢键相互作用网络,其中 D323 的侧链朝向 ADPr 的 1'-OH 和 R42 的-NH2 之间的糖苷键,在水分子的协助下发生亲核攻击,最终催化完成 ADPr 的切除<sup>[16,35]</sup>。

## 2.2 DraG 家族

与 Macrodomain 家族 ARHs 的“三明治”样结构不同,典型的 DraG 样 ARHs 全部由  $\alpha$  螺旋组成其核心结构,其中“催化口袋”位于该结构底物的裂隙中;此外, H3 和 H13 含有一个高度保守的天冬酰胺和苏氨酸残基,这 2 个氨基酸残基对锰离子结合至关重要,锰离子对 DraG 样 ARHs 酶活中心水分子的结合和定位,以及进一步激活对 ADPr 基团的亲核攻击中发挥关键作用<sup>[18]</sup>。

### 2.2.1 DraG

深红小螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)的 DraG 是第一个报道的 DraG-like 家族 ARH,它与 dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT)通过 ADPr 修饰/去修饰共同调控细菌的固氮过程<sup>[64]</sup>。DraT 的活性随着环境的刺激(如黑暗和过量的固定氮源)而增加,并对二氮酶还原酶的 R101 进行 ADPr 修饰使其失活,从而使其停止固氮反应;而当细菌暴露于光照或者氮

源耗尽时, DraG 通过其 ARH 活性将 R101 位点的 ADPr 基团切除以恢复二氮酶还原酶的活性; DraG 的核心结构域全部由  $\alpha$ -螺旋构成(共 16 个), 其催化中心位于其底部形成的“口袋”中, 由多个环结构(loop)构成, 其中 E28-D60-D97 与 1 个水分子以及 2 个  $Mn^{2+}$  共同组成了 DraG 的催化反应核心, 并通过亲核攻击发挥 ADP-核糖基水解酶活性(图 1K); 结构比对表明, DraG 与 ARH3 具有最高的结构相似性, 不同的是后者的催化中心可以结合 2 个  $Mg^{2+}$ , 并且主要催化 PAR 的水解<sup>[17,21]</sup>。

### 2.2.2 Tri1

最近, 在变形斑沙雷氏菌 (*Serratia proteamaculans*) 中新报道了一个 DraG-like 家族 ARHs——Tri1。Tri1 由 T6SS 分泌系统分泌, 作为免疫蛋白与 type VI secretion ADP-ribosyltransferase effector 1 (Tre1) 共同组成一对 effector-immunity protein pair (E-I pair), 参与变形斑沙雷氏菌的种间竞争; Tre1 通过 T6SS 进入竞争细菌内, 对其 FtsZ 上保守 R174 进行 ADPr 修饰, 进而抑制 FtsZ 高聚形成“纤维”结构导致细胞分裂异常, 并最终对竞争细菌展现出细胞毒性; 然而 Tre1 在变形斑沙雷氏菌表达的过程中, 也会对自身产生毒性, 为了避免对自身的杀伤作用, 变形斑沙雷氏菌同时编码了 Tri1, Tri1 可以通过独特的双中和机制中和 Tre1 的细菌毒性; 其中一种是通过 Tri1 的 ADP-核糖基水解酶活性将自身被 ADPr 修饰的 FtsZ 恢复成活性形式而实现的; 结构生物研究表明, Tri1 与经典的 DraG-like 家族 ARHs 一样, 具有一个全部由  $\alpha$ -螺旋构成的核心结构域, 催化中心同样位于底部环状结构形成的“口袋”中, 其中 E90-D161-D317 组成了 Tri1 的催化中心, 催化过程中需要镁离子协同参与催化反应(图 1L); 与经典的 DraG-like 家族 ARHs 不同的是, 除了

核心结构域, Tri1 的 N 端还包含一个延伸的结构域, 即 N 端延伸(N terminal extension, NTE); NTE 由大约 60 个氨基酸组成, 不仅在 Tre1 与 Tri1 的互动中发挥重要作用, 更重要的是 NTE 覆盖于 Tre1 的酶活口袋之上, 从而阻断其与底物的结合并抑制其酶活, 最终还可以通过经典的“封闭”催化中心的形式发挥免疫蛋白的中和活性<sup>[8]</sup>。

## 3 总结与展望

ADPr 修饰作为一种重要的翻译后修饰, 对其研究已经有 60 年的历史, 期间取得了诸多重要的发现, 尤其是对人类等哺乳动物的 ADPr 代谢的深入研究, 为我们理解 ADPr 代谢在 DNA 复制、转录、损伤修复以及信号转导、细胞分裂、细胞应激和微生物感染反应等方面提供了重要支撑<sup>[3,65-67]</sup>。ADPr 修饰异常与多种人类疾病的发展相关, 包括癌症、神经退行性疾病和免疫系统疾病等<sup>[68]</sup>, 对 ADPr 修饰的研究不仅有助于深入理解细胞生物学和病理过程, 还为开发新的治疗策略提供了潜在靶点。例如, PARP 抑制剂已被开发用于治疗某些类型的癌症, 这些抑制剂通过抑制 PARP 的活性, 阻断 DNA 修复途径, 从而诱导癌细胞死亡<sup>[69]</sup>。科研人员也在原核生物中陆续鉴定到了 ADPr 代谢系统的存在, 并对一些人或哺乳动物中存在的 ARTs 和 ARHs 的同源物进行了一定的研究, 发现 ADPr 修饰对原核生物也同样重要, 在细菌的物种间/种内竞争、应激反应和致病性中发挥重要作用, 例如一些病原菌分泌的效应蛋白可以通过 ADPr 修饰/去修饰宿主蛋白质, 动态地改变宿主细胞的信号通路, 以协助病原菌的侵袭和生存<sup>[1,4]</sup>。然而, 相较于对真核生物的 ADPr 修饰的研究, 目前细菌的相关研究还相对欠缺, 主要存在的问题包括:(1) 细菌或致病菌种类繁多

多, 筛选鉴定 ADPr 修饰相关酶存在一定困难; (2) 在长时间的进化过程中, 编码此类蛋白的基因会发生重组、缺失等情况, 最终产生多个进化分支, 其生物学功能也更复杂多样; (3) 对细菌此类酶的关注度不够, 一些蛋白的研究尚停留在生物信息学分析层面, 其底物以及催化机制尚不清楚。

总之, 细菌 ARHs 是一类参与细菌代谢和生存的关键酶, 涉及 DNA 修复、细胞信号传递和基因表达调控等多个生物学过程。研究这些酶的功能和调控机制对于理解细菌如何适应环境压力、逃避宿主免疫系统以及开发新的抗菌策略具有重要意义。此外, ADPr 修饰在 DNA 损伤应答及癌症治疗中也扮演着重要角色, 通过研究细菌 ARHs 的活性和调控机制也可能揭示了新的抗菌或抗癌靶点。在抗生素耐药性日益成为全球性健康问题的背景下, 许多病原菌对现有抗生素的耐药性越来越强, 因此, 仍需更多深入了解细菌 ADPr 信号传导的分子机制, 为设计用于治疗当前和未来传染病的新型抗菌策略提供理论依据。

## 作者贡献声明

焦引弟: 论文撰写和修改; 张路豪: 数据收集和论文修改; 欧阳松应: 论文审阅; 关洪鑫: 论文构思、修改和绘图。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] MIKOLČEVIĆ P, HLOUŠEK-KASUN A, AHEL I, MIKOČ A. ADP-ribosylation systems in bacteria and viruses[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 2366-2383.
- [2] SUSKIEWICZ MJ, PROKHOROVA E, RACK JGM, AHEL I. ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications[J]. *Cell*, 2023, 186(21): 4475-4495.
- [3] ARAVIND L, ZHANG DP, de SOUZA RF, ANAND S, IYER LM. The natural history of ADP-ribosyltransferases and the ADP-ribosylation system[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2015, 384: 3-32.
- [4] RACK JGM, PALAZZO L, AHEL I. (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology[J]. *Genes & Development*, 2020, 34(5/6): 263-284.
- [5] ALVAREZ-GONZALEZ R, ALTHAUS FR. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents[J]. *Mutation Research/DNA Repair*, 1989, 218(2): 67-74.
- [6] RACK JGM, PERINA D, AHEL I. Macrod domains: structure, function, evolution, and catalytic activities[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2016, 85: 431-454.
- [7] BROCHU G, DUCHAINE C, THIBEAULT L, LAGUEUX J, SHAH GM, POIRIER GG. Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1219(2): 342-350.
- [8] TING SY, BOSCH DE, MANGIAMELI SM, RADEY MC, HUANG S, PARK YJ, KELLY KA, FILIP SK, GOO YA, ENG JK, ALLAIRE M, VEESLER D, WIGGINS PA, PETERSON SB, MOUGOUS JD. Bifunctional immunity proteins protect bacteria against FtsZ-targeting ADP-ribosylating toxins[J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1380-1392.e14.
- [9] JANKEVICIUS G, ARIZA A, AHEL M, AHEL I. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA[J]. *Molecular Cell*, 2016, 64(6): 1109-1116.
- [10] ZHANG WC, WANG CL, SONG Y, SHAO C, ZHANG X, ZANG JY. Structural insights into the mechanism of *Escherichia coli* YmdB: a 2'-O-acetyl-ADP-ribose deacetylase[J]. *Journal of Structural Biology*, 2015, 192(3): 478-486.
- [11] APPEL CD, FELD GK, WALLACE BD, WILLIAMS RS. Structure of the sirtuin-linked macrodomain SAV0325 from *Staphylococcus aureus*[J]. *Protein Science*, 2016, 25(9): 1682-1691.
- [12] KARRAS GI, KUSTATSCHER G, BUHECHA HR, ALLEN MD, PUGIEUX C, SAIT F, BYCROFT M, LADURNER AG. The macro domain is an ADP-ribose binding module[J]. *EMBO Journal*, 2005, 24(11): 1911-1920.
- [13] FORST AH, KARLBERG T, HERZOG N, THORSELL AG, GROSS A, FEIJS KLH, VERHEUGD P, KURSULA P, NIJMEIJER B, KREMMER E, KLEINE H, LADURNER AG, SCHÜLER H, LÜSCHER B. Recognition of mono-ADP-ribosylated ARTD10

- substrates by ARTD8 macrodomains[J]. *Structure*, 2013, 21(3): 462-475.
- [14] RACK JGM, ZORZINI V, ZHU ZH, SCHULLER M, AHEL D, AHEL I. Viral macrodomains: a structural and evolutionary assessment of the pharmacological potential[J]. *Open Biology*, 2020, 10(11): 200237.
- [15] FU JQ, LI PW, GUAN HX, HUANG D, SONG L, OUYANG SY, LUO ZQ. *Legionella pneumophila* temporally regulates the activity of ADP/ATP translocases by reversible ADP-ribosylation[J]. *mLife*, 2022, 1(1): 51-65.
- [16] ZHANG ZR, FU JQ, RACK JGM, LI C, VOORNEVELD J, FILIPPOV DV, AHEL I, LUO ZQ, DAS C. *Legionella* metaeffector MavL reverses ubiquitin ADP-ribosylation via a conserved arginine-specific macrodomain[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 2452.
- [17] BERTHOLD CL, WANG H, NORDLUND S, HÖGBOM M. Mechanism of ADP-ribosylation removal revealed by the structure and ligand complexes of the dimanganese mono-ADP-ribosylhydrolase DraG[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14247-14252.
- [18] LI XD, HUERGO LF, GASPERINA A, PEDROSA FO, MERRICK M, WINKLER FK. Crystal structure of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DRAG) reveals conservation in the ADP-ribosylhydrolase fold and specific features in the ADP-ribose-binding pocket[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 390(4): 737-746.
- [19] LAMBRECHT MJ, BRICHACEK M, BARKAUSKAITE E, ARIZA A, AHEL I, HERGENROTHER PJ. Synthesis of dimeric ADP-ribose and its structure with human poly(ADP-ribose) glycohydrolase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(10): 3558-3564.
- [20] ZAPATA-PÉREZ R, GIL-ORTIZ F, MARTÍNEZ-MOÑINO AB, GARCÍA-SAURA AG, JUANHUIX J, SÁNCHEZ-FERRER Á. Structural and functional analysis of *Oceanobacillus iheyensis* macrodomain reveals a network of waters involved in substrate binding and catalysis[J]. *Open Biology*, 2017, 7(4): 160327.
- [21] MOURE VR, COSTA FF, CRUZ LM, PEDROSA FO, SOUZA EM, LI XD, WINKLER F, HUERGO LF. Regulation of nitrogenase by reversible mono-ADP-ribosylation[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2015, 384: 89-106.
- [22] BENTLEY SD, CHATER KF, CERDEÑO-TÁRRAGA AM, CHALLIS GL, THOMSON NR, JAMES KD, HARRIS DE, QUAIL MA, KIESER H, HARPER D, BATEMAN A, BROWN S, CHANDRA G, CHEN CW, COLLINS M, CRONIN A, FRASER A, GOBLE A, HIDALGO J, HORNSBY T, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [23] MUNNUR D, BARTLETT E, MIKOLČEVIĆ P, KIRBY IT, RACK JGM, MIKOČ A, COHEN MS, AHEL I. Reversible ADP-ribosylation of RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(11): 5658-5669.
- [24] AGNEW T, MUNNUR D, CRAWFORD K, PALAZZO L, MIKOČ A, AHEL I. MacroD1 is a promiscuous ADP-ribosyl hydrolase localized to mitochondria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 20.
- [25] SLADE D, DUNSTAN MS, BARKAUSKAITE E, WESTON R, LAFITE P, DIXON N, AHEL M, LEYS D, AHEL I. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase[J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 616-620.
- [26] CHO CC, CHIEN CY, CHIU YC, LIN MH, HSU CH. Structural and biochemical evidence supporting poly ADP-ribosylation in the bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1491.
- [27] GARCÍA-SAURA AG, ZAPATA-PÉREZ R, HIDALGO JF, CABANES J, GIL-ORTIZ F, SÁNCHEZ-FERRER Á. An uncharacterized FMAG\_01619 protein from *Fusobacterium mortiferum* ATCC 9817 demonstrates that some bacterial macrodomains can also act as poly-ADP-ribosylhydrolases[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3230.
- [28] DEEP A, SINGH L, KAUR J, VELUSAMY M, BHARDWAJ P, SINGH R, THAKUR KG. Structural insights into DarT toxin neutralization by cognate DarG antitoxin: ssDNA mimicry by DarG C-terminal domain keeps the DarT toxin inhibited[J]. *Structure*, 2023, 31(7): 780-789.e4.
- [29] LeROUX M, SRIKANT S, TEODORO GIC, ZHANG T, LITTLEHALE ML, DORON S, BADIEE M, LEUNG AKL, SOREK R, LAUB MT. The DarTG toxin-antitoxin system provides phage defence by ADP-ribosylating viral DNA[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(7): 1028-1040.
- [30] JOHANNESMAN A, CARLSON NA, LeROUX M. Phages carry orphan antitoxin-like enzymes to neutralize the DarTG1 toxin-antitoxin defense system[J]. *bioRxiv*, 2024: 2024.07.11.602962.
- [31] LALIĆ J, POSAVEC MARJANOVIĆ M, PALAZZO L, PERINA D, SABLJIĆ I, ŽAJA R, COLBY T, PLEŠE B, HALASZ M, JANKEVICIUS G, BUCCA G, AHEL M, MATIĆ I, ČETKOVIĆ H, LUIĆ M, MIKOČ A, AHEL I. Disruption of macrodomain protein SCO6735 increases antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(44): 23175-23187.
- [32] FU JQ, ZHOU MW, GRITSENKO MA, NAKAYASU ES, SONG L, LUO ZQ. *Legionella pneumophila*

- modulates host energy metabolism by ADP-ribosylation of ADP/ATP translocases[J]. *eLife*, 2022, 11: e73611.
- [33] KUBORI T, LEE J, KIM H, YAMAZAKI K, NISHIKAWA M, KITAO T, OH BH, NAGAI H. Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired *Legionella* effector proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(23): e2122872119.
- [34] AKTURK A, WASILKO DJ, WU XC, LIU Y, ZHANG Y, QIU JZ, LUO ZQ, REITER KH, BRZOVIC PS, KLEVIT RE, MAO YX. Mechanism of phosphoribosyl-ubiquitination mediated by a single *Legionella* effector[J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 729-733.
- [35] FU JQ, LI SY, GUAN HX, LI C, ZHAO YB, CHEN TT, XIAN W, ZHANG ZR, LIU Y, GUAN QT, WANG JT, LU QH, KANG LN, ZHENG SR, LI JY, CAO SJ, DAS C, LIU XY, SONG L, OUYANG SY, LUO ZQ. *Legionella* maintains host cell ubiquitin homeostasis by effectors with unique catalytic mechanisms[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5953.
- [36] SLADE D, DUNSTAN MS, BARKAUSKAITE E, WESTON R, LAFITE P, DIXON N, AHEL M, LEYS D, AHEL I. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase[J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 616-620.
- [37] WANG ZZ, GAGNÉ JP, POIRIER GG, XU WQ. Crystallographic and biochemical analysis of the mouse poly(ADP-ribose) glycohydrolase[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86010.
- [38] BARKAUSKAITE E, BRASSINGTON A, TAN ES, WARWICKER J, DUNSTAN MS, BANOS B, LAFITE P, AHEL M, MITCHISON TJ, AHEL I, LEYS D. Visualization of poly(ADP-ribose) bound to PARG reveals inherent balance between exo- and endo-glycohydrolase activities[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2164.
- [39] SCHULLER M, BUTLER RE, ARIZA A, TROMANS-COIA C, JANKEVICIUS G, CLARIDGE TDW, KENDALL SL, GOH S, STEWART GR, AHEL I. Molecular basis for DarT ADP-ribosylation of a DNA base[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 597-602.
- [40] SCHULLER M, RAGGIASCHI R, MIKOLCEVIC P, RACK JGM, ARIZA A, ZHANG YG, LEDERMANN R, TANG C, MIKOC A, AHEL I. Molecular basis for the reversible ADP-ribosylation of guanosine bases[J]. *Molecular Cell*, 2023, 83(13): 2303-2315.e6.
- [41] ROSENTHAL F, FEIJS KLH, FRUGIER E, BONALLI M, FORST AH, IMHOF R, WINKLER HC, FISCHER D, CAFLISCH A, HASSA PO, LÜSCHER B, HOTTIGER MO. Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(4): 502-507.
- [42] JANKEVICIUS G, HASSLER M, GOLIA B, RYBIN V, ZACHARIAS M, TIMINSZKY G, LADURNER AG. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(4): 508-514.
- [43] FEHR AR, CHANNAPPANAVAR R, JANKEVICIUS G, FETT C, ZHAO JC, ATHMER J, MEYERHOLZ DK, AHEL I, PERLMAN S. The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection[J]. *mBio*, 2016, 7(6): e01721-16.
- [44] LI CQ, DEBING Y, JANKEVICIUS G, NEYTS J, AHEL I, COUTARD B, CANARD B. Viral macro domains reverse protein ADP-ribosylation[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(19): 8478-8486.
- [45] LEI J, KUSOV Y, HILGENFELD R. Nsp3 of coronaviruses: structures and functions of a large multi-domain protein[J]. *Antiviral Research*, 2018, 149: 58-74.
- [46] RACK JGM, MORRA R, BARKAUSKAITE E, KRAEHENBUEHL R, ARIZA A, QU Y, ORTMAYER M, LEIDECKER O, CAMERON DR, MATIC I, PELEG AY, LEYS D, TRAVEN A, AHEL I. Identification of a class of protein ADP-ribosylating sirtuins in microbial pathogens[J]. *Molecular Cell*, 2015, 59(2): 309-320.
- [47] CHEN DW, VOLLMAR M, ROSSI MN, PHILLIPS C, KRAEHENBUEHL R, SLADE D, MEHROTRA PV, von DELFT F, CROSTHWAITE SK, GILEADI O, DENU JM, AHEL I. Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 13261-13271.
- [48] KIM T, LEE J, KIM KS. *Escherichia coli* YmdB regulates biofilm formation independently of its role as an RNase III modulator[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 266.
- [49] FONTANA P, BONFIGLIO JJ, PALAZZO L, BARTLETT E, MATIC I, AHEL I. Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3[J]. *eLife*, 2017, 6: e28533.
- [50] PERINA D, MIKOČ A, AHEL J, ČETKOVIĆ H, ŽAJA R, AHEL I. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life[J]. *DNA Repair*, 2014, 23: 4-16.
- [51] TUCKER JA, BENNETT N, BRASSINGTON C, DURANT ST, HASSALL G, HOLDGATE G, McALISTER M, TRUMAN C, WATSON M. Structures of the human poly(ADP-ribose) glycohydrolase catalytic domain confirm catalytic mechanism and explain inhibition by ADP-HPD derivatives[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50889.
- [52] VILCHEZ LARREA SC, SCHLESINGER M, KEVORKIAN ML, FLAWIÁ MM, ALONSO GD,

- FERNÁNDEZ VILLAMIL SH. Host cell poly(ADP-ribose) glycohydrolase is crucial for *Trypanosoma cruzi* infection cycle[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67356.
- [53] FENG BM, LIU CL, de OLIVEIRA MVV, INTORNE AC, LI B, BABILONIA K, de SOUZA FILHO GA, SHAN LB, HE P. Protein poly(ADP-ribosyl)ation regulates *Arabidopsis* immune gene expression and defense responses[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(1): e1004936.
- [54] LIU YQ, ZHOU JZ, OMELCHENKO MV, BELIAEV AS, VENKATESWARAN A, STAIR J, WU LY, THOMPSON DK, XU D, ROGOZIN IB, GAIDAMAKOVA EK, ZHAI M, MAKAROVA KS, KOONIN EV, DALY MJ. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 4191-4196.
- [55] AHEL D, HOREJSÍ Z, WIECHENS N, POLO SE, GARCIA-WILSON E, AHEL I, FLYNN H, SKEHEL M, WEST SC, JACKSON SP, OWEN-HUGHES T, BOULTON SJ. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1[J]. Science, 2009, 325(5945): 1240-1243.
- [56] AHEL I, VUJAKLIJA D, MIKOČ A, GAMULIN V. Transcriptional analysis of the *recA* gene in *Streptomyces rimosus*: identification of the new type of promoter[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 129-133.
- [57] GAMULIN V, CETKOVIC H, AHEL I. Identification of a promoter motif regulating the major DNA damage response mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238(1): 57-63.
- [58] SBERRO H, LEAVITT A, KIRO R, KOH E, PELEG Y, QIMRON U, SOREK R. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning[J]. Molecular Cell, 2013, 50(1): 136-148.
- [59] YAMAGUCHI Y, PARK JH, INOUE M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. Annual Review of Genetics, 2011, 45: 61-79.
- [60] SHARIFI R, MORRA R, APPEL CD, TALLIS M, CHIOZA B, JANKEVICIUS G, SIMPSON MA, MATIC I, OZKAN E, GOLIA B, SCHELLENBERG MJ, WESTON R, WILLIAMS JG, ROSSI MN, GALEHDARI H, KRAHN J, WAN A, TREMBATH RC, CROSBY AH, AHEL D, et al. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease[J]. The EMBO Journal, 2013, 32(9): 1225-1237.
- [61] LAWARÉE E, JANKEVICIUS G, COOPER C, AHEL I, UPHOFF S, TANG CM. DNA ADP-ribosylation stalls replication and is reversed by RecF-mediated homologous recombination and nucleotide excision repair[J]. Cell Reports, 2020, 30(5): 1373-1384.e4.
- [62] ZAVERI A, WANG RJ, BOTELLA L, SHARMA R, ZHU LN, WALLACH JB, SONG NM, JANSEN RS, RHEE KY, EHRT S, SCHNAPPINGER D. Depletion of the DarG antitoxin in *Mycobacterium tuberculosis* triggers the DNA-damage response and leads to cell death[J]. Molecular Microbiology, 2020, 114(4): 641-652.
- [63] BHOGARAJU S, KALAYIL S, LIU YB, BONN F, COLBY T, MATIC I, DIKIC I. Phosphoribosylation of ubiquitin promotes serine ubiquitination and impairs conventional ubiquitination[J]. Cell, 2016, 167(6): 1636-1649.e13.
- [64] HUERGO LF, CHUBATSU LS, SOUZA EM, PEDROSA FO, STEFFENS MBR, MERRICK M. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*[J]. FEBS Letters, 2006, 580(22): 5232-5236.
- [65] BOCK FJ, CHANG P. New directions in poly(ADP-ribose) polymerase biology[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(22): 4017-4031.
- [66] GUPTE R, LIU ZY, KRAUS WL. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes[J]. Genes & Development, 2017, 31(2): 101-126.
- [67] RECHKUNOVA NI, MALTSEVA EA, LAVRIK OI. Post-translational modifications of nucleotide excision repair proteins and their role in the DNA repair[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2019, 84(9): 1008-1020.
- [68] HOCH NC, POLO LM. ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease[J]. Genetics and Molecular Biology, 2019, 43(1 suppl 1): e20190075.
- [69] RAJAWAT J, SHUKLA N, MISHRA DP. Therapeutic targeting of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in cancer: current developments, therapeutic strategies, and future opportunities[J]. Medicinal Research Reviews, 2017, 37(6): 1461-1491.