

解旋酶RECQ5 β 的DNA解旋 及退火过程动力学研究

徐雅楠 著

徐雅楠



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

解旋酶RECQ5 β 的DNA解旋 及退火过程动力学研究

徐雅楠 著



黑龙江大学出版社

HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

解旋酶 RECQ5 β 的 DNA 解旋及退火过程动力学研究 /
徐雅楠著. — 哈尔滨 : 黑龙江大学出版社, 2018. 10
ISBN 978-7-5686-0208-2

I. ①解… II. ①徐… III. ①酶学—动力学—研究
IV. ①Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 060885 号

解旋酶 RECQ5 β 的 DNA 解旋及退火过程动力学研究
JIEXUANMEI RECQ5 β DE DNA JIEXUAN JI TUIHUO GUOCHENG
DONGLIXUE YANJIU
徐雅楠 著

责任编辑 高 媛
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府三道街 36 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 880 毫米 $\times$ 1230 毫米 1/32
印 张 4.625
字 数 104 千
版 次 2018 年 10 月第 1 版
印 次 2018 年 10 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5686-0208-2
定 价 14.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

RECQ 家族的解旋酶被称为基因组的守护者。它们是进化上高度保守的 DNA 解旋酶,并在基因组的重组、修复的过程中发挥作用,维持基因组的完整性和稳定性。基因组的不稳定是许多疾病发生的重要条件。在人类细胞中,已经确定 RECQ 家族有五个成员:BLM、WRN、RECQ4、RECQ1 和 RECQ5。其中三个解旋酶的缺失或者变异会导致一些肿瘤易患型综合征及早衰型综合征,包括布鲁姆综合征(Bloom's syndrome, BLM)、沃纳综合征(Werner syndrome, WRN)、色素沉着综合征(Rothmund - Thomson)、巴特 - 盖罗尔特综合征(Baller - Gerold syndromes)。虽然这些疾病的临床表现各异,但都产生癌症易患以及基因组不稳定现象,说明 RECQ 家族成员在维持基因组的稳定性上起到重要作用。

因此,为了更好地了解 and 阐明 RECQ 家族解旋酶的生理功能,理解 RECQ 家族解旋酶的工作机制和功能调节过程,给出细胞内作用的关键调控步骤的线索,必将为相关疾病的治疗提供有意义的信息。

RECQ 家族解旋酶是组成解旋酶超家族 SF2 的成员之一。在

研究 RECQ 家族的解旋酶过程中发现,它们不仅具有解旋酶的活性,有些还具有促进 DNA 退火的活性或核酸外切酶的活性。这些解旋酶所具有的生化活性应该是与其生物学功能相对应的。我们研究的目标蛋白是人类 RECQ 家族的成员 RECQ5 解旋酶。

RECQ5 解旋酶具有解旋和退火的双重活性。其解旋和退火的动力学机制现在都还不清楚。结合快速停流和荧光滴定设备,利用荧光共振能量转移的方法,系统地研究了 RECQ5 的结合、解旋以及退火的动力学过程。首先,对 RECQ5 的解旋特性有了初步的了解。其次,还进行了 ATP 水解循环中 RECQ5 解旋酶与 DNA 的结合和解离动力学的研究,对 RECQ5 与 DNA 的作用过程有了清楚的了解,并通过对退火动力学实验数据的分析,提出了 RECQ5 促进单链 DNA 退火形成双链过程的动力学模型。

在 RECQ 解旋酶家族中,我们对 RECQ5 的功能和作用了解最少。RECQ5 在体内通过选择性剪切产生不同的异构体,而每种异构体具有的活性又不尽相同。作为解旋酶,同时具有的退火活性是否在重组、修复等过程中起到关键作用也尚未知晓。近年来,本课题组围绕 RECQ 解旋酶家族不同成员展开了多角度的动力学研究,旨在从分子机制角度搜寻证据用以进一步揭示其功能,现取得了部分成果,结合现国内外研究成果,集合成书。本书分为:解旋酶研究进展、快速停流研究方法、RECQ5 解旋及退火动力学研究几部分。旨在阐明 RECQ5 解旋酶与 DNA 的结合和解离的动力学过程,为进一步解析 RECQ5 解旋酶的生理功能,阐明其在维持基因组稳定过程中所起的作用奠定基础。

本书的完成得到笔者导师——中国科学院大学窦硕星研究员的悉心指导,西北农林科技大学奚绪光教授的鼎力帮助,远在美国

的杨晔博士、丁秀燕博士的无私付出,以及黑龙江大学出版社的大力支持,谨在此表示衷心感谢。本书成书仓促,疏漏之处敬请批评指正。

徐雅楠

2018年4月

目 录

第 1 章 解旋酶及常用研究方法	1
1.1 解旋酶的发现及发展历程	3
1.2 解旋酶的分类和结构特征	5
1.3 解旋酶的生物学活性	11
1.4 解旋酶的作用机制	24
1.5 解旋酶的停顿、倒退、穿梭及重复解旋	30
1.6 解旋酶的研究方法	34
1.7 基因组完整性与 RecQ 解旋酶家族—— 基因组守护者	36
1.8 RECQ5 解旋酶的结构与功能研究进展	46
第 2 章 快速停流法的实验技术	49
2.1 仪器结构及主要谱参量	52
2.2 荧光共振能量转移技术检测解旋及退火过程	58
2.3 利用快速停流法研究 DNA 解旋酶的解旋 及退火动力学机制	62

第 3 章 利用荧光共振能量转移技术研究 RECQ5

对 DNA 的解旋及退火动力学.....	63
3.1 实验方法	65
3.2 实验结果	77
3.3 结果讨论	94

第 4 章 结 论

参考文献

第一章

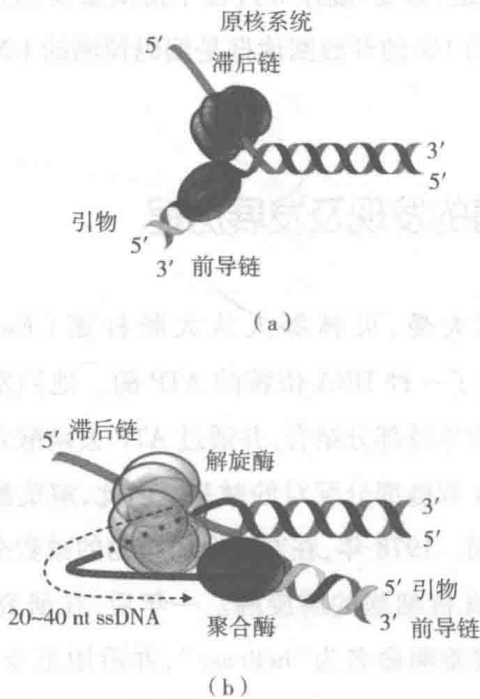
解旋酶及常用研究方法

在生命体中,核酸作为遗传信息的主要载体,提供构建有机体所需要的信息。核酸主要是以 DNA 和 RNA 的形式存在于细胞中。无论是原核细胞还是真核细胞,在生命周期不同的阶段中核酸(DNA 和 RNA)都会有单链和双链两种存在形式。为了获取许多生物学过程所需的重要信息,双链的核酸需要被瞬时解开成单链。这种结构形式的转换就是在解旋酶的作用下打开氢键而实现的。解旋酶通过利用核苷三磷酸(NTP)高能磷酸键的水解产生的自由能解开核酸双链。解旋酶在真核生物、原核生物及病毒中广泛存在,并在复制、重组、修复、翻译等过程中扮演重要的角色。在人类基因组中,有大约 1% 的开放阅读框是编码预测的 DNA 和 RNA 解旋酶。

1.1 解旋酶的发现及发展历程

1976 年,霍夫曼、贝林等人从大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)中分离出了一种 DNA 依赖的 ATP 酶。他们发现这种酶能够与 DNA 底物的单链部分结合,并通过 ATP 去磷酸化释放的能量持续地打开 DNA 双链部分配对的碱基。由此,解旋酶被发现并命名为 DNA 解旋酶。1978 年,在对百合属植物的减数分裂进行研究时,首次发现了真核细胞的解旋酶。一年后,在研究大肠杆菌的 Rep 蛋白时,将解旋酶命名为“helicase”,并沿用至今。此后,人们又陆续在不同的生命体中发现了多种解旋酶。因为解旋酶涉及大量细胞的生命过程,所以发现了许多不同类型和功能的解旋酶。即使是相对简单的大肠杆菌中都存在至少 11 种不同类型的解旋酶。人类细胞中发现的解旋酶不少于 25 种。

解旋酶的研究方向包括基本的生化特性、晶体结构、作用机制等方面。随着 RNA 结构功能、基因组学以及蛋白质组学等领域研究的兴起,保守的解旋酶家族的基因和蛋白结构所包含的信息也开始吸引科学家的注意,如在酵母中发现的 Q - 基序(Q - motif)。Q - 基序不仅在解旋酶中对 RNA 结合和 ATP 酶活性有重要的作用,而且存在于病毒的包装蛋白中,其对包装蛋白的效率有很大的影响。



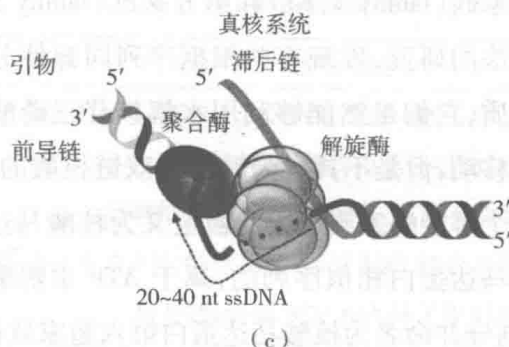


图 1.1 在复制叉上的解旋酶和 DNA 聚合酶

(a) 原核生物细胞 DNA 复制叉中在前导链上结合的 DNA 聚合酶和六聚体环状结构的解旋酶；(b) 和 (c) 真核生物细胞电镜研究得到的两种复制模型，(b) 为解旋酶的 C 末端结构域面对复制叉，且 DNA 聚合酶复合体在解旋酶前面，(c) 为 N 末端结构域朝向复制叉，且位于前导链上的 DNA 聚合酶复合体位于解旋酶之后

1.2 解旋酶的分类和结构特征

在现今的研究工作中，解旋酶的分类，由于分类标准的差异而出现许多种方法。解旋酶按照作用底物分类，可分为 DNA 解旋酶和 RNA 解旋酶；按照生物来源分类，可分为真核、原核、古细菌和病毒解旋酶；按照解开核酸链的方向分类，可分为 5' - 3' 解旋酶和 3' - 5' 解旋酶；按照解旋酶活性聚集状态分类，可分为单体、双体和多聚体解旋酶。根据解旋酶的序列同源性分类，可分为三个蛋白质超家族：第一超家族 (super - family 1, SF1)，第二超家族 (super - family 2, SF2)，第三超家族 (super - family 3, SF3)，以及两个蛋白质

家族——第四家族(family 4, F4)和第五家族(family 5, F5)。通过同源性分类方法的研究,发现有些根据序列同源性分析可推测为解旋酶的蛋白质,它们虽然能够利用水解核苷三磷酸获得能量在核酸链上定向移动,但是不具有分开互补双链核酸的活性。所以,最初定义的五個解旋酶家族也因此被定义为核酸马达蛋白。而另外的具有核酸马达蛋白相似序列的,属于 ATP 水解酶驱动的多功能蛋白质,被划分并命名为核酸马达蛋白第六超家族(super-family 6, SF6),表 1.1 中给出了所有 6 个家族的保守的序列模体。

以上均以解旋酶的功能和结构特点为依据分类,而为了更好地研究其工作机制,现又提出了新的辅助分类方法。首先,根据定向移动的方向,可分为 A 类和 B 类,分别代表 3'起始及 5'起始的定向移动。在以上分类体系中, SF1、SF2 及 SF6 都包含以上两种方向类型, SF3 仅包含 A 类,而 F4、F5 仅包含 B 类。其次,根据中心结构域与单双链的核酸作用,可分为 α 类和 β 类。但这一分类并不绝对,根据已发表的结果, SF1 仅包含 α 类即与单链核酸直接结合, SF2 同时包含两种类型,而其他环状家族均包含以上两种类型。然而到目前为止,各种分类方法并不能直接提示相关解旋机制。

这几种分类方法从不同的角度描述了一个解旋酶的基本特性,在研究中结合起来使用能够更好地定位解旋酶。如对线粒体和基因组稳定性维持有关键作用的 Pif1 解旋酶家族几乎存在于所有真核生物细胞中,是 5' - 3' 方向的解旋酶,并分属于第一超家族。RECQ 解旋酶家族是属于第二超家族的 DNA 解旋酶,在原核和真核细胞中都有该家族的成员存在。

表 1.1 保守基序特性

基序	已知功能
I	P-环; Walker A 的 NTP 结合基序; 与 NTP 结合
I _a	通过糖磷酸骨架结合底物
I _b	底物结合; 并不高度保守, 可能不总是存在
II	Walker B 的 NTP 结合基序; 通过 Mg^{2+} 结合 β 磷酸基团和 γ 磷酸基团; 协调 NTP 和水分子作用水解
III	结合 γ 磷酸基团; NTP 水解和解旋活性的偶联
IV	底物结合; 在 SF1 DNA 解旋酶中被称为 IV _a
V	通过糖磷酸骨架结合底物; 与 NTP 相互作用
VI	结合 γ 磷酸基团; 通过结构域 1 和 2 移动转变 NTP 结合/水解

解旋酶解开核酸双链的过程是与核苷三磷酸的水解相偶联的。根据其序列的差异而区分开来的各个家族的解旋酶依然具有共同的结构特点。核心结构域或解旋活性中心(core domains)是由两个类似于 RecA 的结构折叠而成的。该结构包括保守序列模体 Walk A 基序、Walker B 基序(简称 Walker A、Walker B)和精氨酸指状结构。作用是将 NTP 水解后的化学能转变为机械能,并引起蛋白质本身构象的变化。在 SF1 及 SF2 单体中,一条多肽链包含两个类似于 RecA 的折叠结构,而在其他家族中多以六聚体环形或双层六聚体环形形式存在,每个亚基仅包含一个类 RecA 结构,因此对应的共有 6 个或 12 个类 RecA 结构。在 SF1 和 SF2 中 Walker A 和 Walker B 分别对应着基序 I 和 II, Walker A 中包含有一个高度保守的赖氨酸残基(Lys, K),这一氨基酸残基是三磷酸腺苷结合位点“P-环”中的一部分。 Mg^{2+} 对于 NTP 的水解非常重要。Walker B 也叫 DEAD 或 DE $\times$ H-盒结构,通常通过天冬氨酸(Asp,

D) 与 Mg^{2+} 等二价金属离子相作用。通过对突变体的研究, 证明 SF2 中的基序 III 结构域和 $ATP - \gamma - PO_4$ 的结合能协同基序 I、II、IV 以及 RecA 结构域共同形成高亲和性的 RNA 单链结合位点, 并能够帮助激活 ATP 的 β 磷酸基团、 γ 磷酸基团。

过去十几年得到的 SF1 家族的解旋酶晶体结构显示: 以上的解旋酶基序都聚集在一起, 形成两个 RecA 结构域, 它们之间是一个 ATP 结合口袋, 另外还有一部分作为核酸结合位点。图 1.2 中为两个 SF1A 解旋酶 (PcrA 和 UvrD) 和两个 SF1B 解旋酶 (RecD2 和 Dda) 的晶体结构。与其他的 SF1 解旋酶类似, PcrA 由四个结构域组成 (1A、2A、1B 和 2B)。ATP 结合位点位于两个 RecA 结构域中间的一个狭缝内 (1A 和 2A)。狭缝的开合对应着核苷酸的结合和水解, 并可能发生移位。在 UvrD 中, ATP 类似物 AMPPNP 的结合诱导 2A 结构域 (相对于其他三个结构域) 发生了 20° 的扭转。

虽然 SF1A 和 SF1B 解旋酶在结构上具有极大的相似性, 但是它们沿着相反的方向迁移。比较 PcrA 和 RecD2, 可以看到 SF1A 和 SF1B 解旋酶结合单链 DNA 的方向相同 (2A 结构域结合 DNA 的 5' 端, 1A 结构域结合 DNA 的 3' 端)。RecA 结构域随着 ATP 的结合与 DNA 结合, 结合相对较弱的结构域向着结合紧密的结构域移动。对于 PcrA (SF1A), 随着 ATP 的结合, 1A 结构域向着 2A 结构域移动, 向着 3' - 5' 方向移动。而对于 RecD2 (SF1B), ATP 的结合使 2A 结构域朝着 1A 结构域移动, 向着 5' - 3' 方向移动。

T7 的六聚体解旋酶 Gp4 结合 dTTP 的晶体结构显示: NTP 酶的活性位点位于各亚基间的界面上。这样的安排可以理解为 NTP 的结合和水解能够通过亚基界面转换成蛋白构象的变化, 从而使其沿核酸链移动。通过对 AAA + 家族 E1 解旋酶和 RecA 家族 Rho

解旋酶的结构的进一步研究,我们得到了很多细节性的信息。E1 解旋酶沿单链的 3'-5'方向移动,而 Rho 解旋酶沿相反的方向5'-3'移动。这两个解旋酶虽然是沿核酸链相反的方向移动,但是单链核酸和中央孔道结合具有相同的极性——核酸链的 5'末端与蛋白的 N 末端结构域靠近。

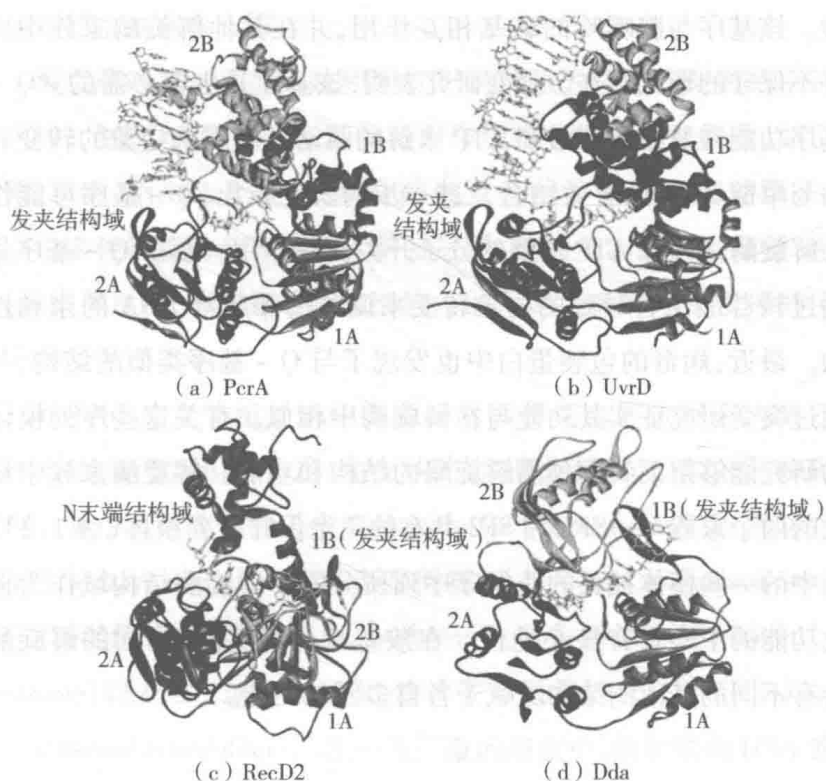


图 1.2 SF1A(PcrA,UvrD)和 SF1B(RecD2,Dda)解旋酶的晶体结构

(a) 枯草芽孢杆菌的 PcrA 解旋酶的带状图解(蛋白数据库编号 3PJR)

(b) 大肠杆菌 UvrD 解旋酶(蛋白数据库编号 2IS1)

(c) 耐辐射球菌的 RecD2 解旋酶的结构(蛋白数据库编号 3GPL)

(d) T4 噬菌体的 Dda 解旋酶与 ssDNA 结合(蛋白数据库编号 3UPU)