

牛乳头瘤病毒蛋白 E2 靶 DNA 结合区结构研究

天津医科大学附属第一中心医院核医学科(天津, 300192) 王学谦编译 林 汉* 审校

摘 要: 乳头瘤病毒(PV)转录的主要调节因子是 E2 蛋白。在人乳头瘤病毒中, E2 蛋白调节癌基因 E6 和 E7 的表达。E2 行使功能的方式是与靶 DNA 的一段由 12 个碱基对组成的回文序列(E2-BS)发生特异的相互作用。因此, 阐明 E2 蛋白对靶 DNA 的选择性立体化学机制是研究此类致癌病毒转录调节的关键。牛 PV-1(BPV-1) E2 蛋白的靶 DNA 结合区的晶体结构显示出一种新的二聚体形式蛋白/DNA 结合方式。蛋白质为二聚体 β -折叠桶, 其外表面为起识别作用的 α -螺旋。DNA 蛋白界面上分布着复杂交织的氢键网, DNA 光滑地环绕于 E2 折叠桶上, 并将识别性 α -螺旋包绕于 DNA 大沟中。

关键词: BPV-1 DNA-E2 蛋白复合物

乳头瘤病毒(PV)是一类 DNA 致癌病毒, 可导致从良性的上皮瘤到宫颈癌的多种肿瘤。PV 转录的关键调节蛋白是基因 E2 产物。有关 BPV-1(牛乳头瘤病毒-1) E2 的 DNA 结合域与 DNA 上的 E2 结合位点的复合体晶体结构本文将作介绍。

1 乳头瘤病毒编码的蛋白质

BPV 基因组为一环状双链 DNA 可读框 E6 和 E7 编码病毒转化作用所需的致癌蛋白。E2 基因的产物包括一个完整的转录调节因子和两个切断形式的阻遏因子。在致病力很强的人类乳头瘤病毒株 HPV-16 和 HPV-18 中, E2 蛋白对 E6 和 E7 的启动子有阻遏作用。当病毒感染宿主时, 病毒基因组整合到宿主基因组中, E2 读框被破坏, 此时 E6 和 E7 可以自由表达。E6 蛋白与细胞普遍存在的肿瘤抑制蛋白 P53 结合, 并将 P53 转运至依赖该蛋白的蛋白酶系统, 使 P53 被破坏。同样 E7 蛋白与另一种细胞内肿瘤抑制蛋白 pRB 形成复合物, 并使之导致降解。这两种细胞生长调节因子的失活导致了细胞增生失控而癌变。

E2 蛋白是乳头瘤病毒转录的关键调节

因子; 通过与 E1 蛋白结合, 它还可以参与病毒的复制过程。它的二聚体形式与 DNA 上一段 12bp 回文序列(E2-BS)结合从而行使功能, 这种结合呈高度特异且亲和力很强。E2 的 DNA 结合域(E2-DBD)与 DNA 构成的复合体晶体结构研究揭示了蛋白/DNA 界面复杂精细的立体化学结构。

2 结构测定方法

E2-DBD/DNA 复合物晶体属于三角晶系的空间组 R32, 分辨率大于 1.7 Å。用 Rigaku RU-200 型 X 射线发生器产生 1.54 Å 单色 X 光进行探测并用 Hamlin 区探测器采集数据, 采用单一同晶型置换法(在寡核苷酸中以碘-U 取代 T)和天然晶体中镧产生的不规则散射来推断结构。经过以上步骤计算出的电子密度图可清楚地解释结果, 根据该图建立模型。用“模拟退火”和最小二乘法结合进行精确计算。

在一般的 X 射线晶体衍射中, 只能测定强度, 不能确定相位信息。为推算相位, 求助于重原子进行同晶型置换。对 E2/DNA 复合物晶体来说, 结晶时所用的镧离子产生特殊的散射成分。从这种异常散射的数据引起的

* 中国医学科学院放射医学研究所

Bijvoet 差异计算得到 Patterson 图,它显示了镧的结合位置以及初始相位信息。利用晶体中存在的镧进行多波长衍射可以获得正确的相位信息。这种实验需用同步加速器,它有高度精确性和重复性。该方法的相位信息超越衍射的界限位,并使以下两种情况成为可

能:①使随机噪声减至最小,减小非同晶型的系统误差以及多同晶型置换法其它固有误差。②估算纯实验状态(MAD)得到的模型与依据传统模型经精确计算而得的模型之间的差异。

图 1 E2-DBD 复合物二聚体的拓朴图显示二级结构的空分布。桶状结构形成方式是把图形的边缘向读者卷曲,边缘通过反平行 β -链间的氢键封闭。

3 E2-DBD/DNA 复合体

对 E2-DBD/DNA 复合物分析要解决的结构问题有:

▲ E2-DBD 是折叠成一个可识别的结合域,还是如前所述的 DNA 结合位点?

▲ E2-DBD 识别 DNA 的立体化学决定子是什么?

▲ E2-DBD 和 E2-BS 形成复合体的构象变化是什么?

4 DNA 结合方式

DNA 结合蛋白的类型主要有:

① 螺旋-转折-螺旋:如色氨酸阻遏物,它的第二螺旋为识别螺旋,插入 DNA 大沟中进行碱基特异性相互作用。

② 锌指蛋白:如糖皮质激素受体,它通过

一个以 Zn 为核心的识别螺旋与 DNA 大沟中的碱基作用。

③ 亮氨酸拉链蛋白:如 GCN4(酵母转录调节因子)和 E-EBP(增强子结合蛋白)两个 α -螺旋中的 7 个重复亮氨酸排列成卷曲的螺旋而形成并指结构。结果,亮氨酸拉链形成二聚体使 α -螺旋伸入 DNA 大沟。

E2 蛋白不属于以上各结构形式,它是一个二聚体的八片反平行 β 折叠,外表面分布着具有识别作用的 α -螺旋,每个亚单位由四股反平行 β 折叠组成,然后共同形成一个拱形 β 片层,它的拓朴结构如图所示。图中两个亚单位一黑一白,识别螺旋连在每个亚单位的 β_1 和 β_2 链之间,另一个跨越连接在 β_3 和 β_4 链之间,它包括一个小的 α -螺旋和一个延伸的 β 结构;两个亚基连在一起,形成一个连续片层并卷成一个 β 折叠桶。DNA 绕在桶上,

使大沟与识别螺旋对合。

图 2 在桶状结构轴线俯视 E2-DNA 复合物的示意图

5 DNA 特异结合的立体化学基础

导致 E2-DBD/E2-BS 特异性结合和高亲和力的原因如下:

① 蛋白侧链与 DNA 碱基间的氢键和静电场相互作用,这与酶-底物,蛋白-药物,蛋白-配体相互作用的经典模型相一致,它包括 Asn336 和 A-6, C-5; Lys339 和 G-4, G-5, Cys340 和 G-5, A-6 的相互作用。这些相互作用的显著特征是每个氨基酸异地跨占两个碱基对。

② 水介导的蛋白-碱基相互作用,在蛋白/DNA 相互作用,这种水分子参与大分子界面的现象正越来越多地被发现。

③ Phe343 和 T-6 间的疏水范德华相互作用。

④ 蛋白质与 DNA 碱基之间水介导的相互作用。这种发生于大分子界面的作用,现已更多地见于蛋白质/DNA 结构。

⑤ 氨基酸侧链与磷酸基团间的直接的和由水介导的相互作用很多见,且部分说明了蛋白/DNA 间的高亲和性。

⑥ DNA 缠绕 E2 β 折叠桶而发生 DNA 的序列依赖性形变,是为了与识别螺旋产生最佳特异相互作用。E2-DBD 复合物比较坚

固,它没有螺旋-转折-螺旋蛋白那样的“柔性阅读头”。它连接的 β_1 和 β_2 螺旋没有与直链 DNA 大沟发生相互作用所需的柔性。于是 E2-BS 就必须与 E2 折叠桶的空间结构相适应。E2-BS 复合物光滑地曲绕在蛋白上,对任何碱基对均没有明显的绞缠,曲率半径约为 45Å。

该蛋白/DNA 复合物的解离常数 K_d 在 10^9 数量级,上述各种相互作用不但决定了高亲和性,并且决定了碱基顺序识别的高度准确性。

6 结论

BPV-1 E2-DBD/DNA 复合物的晶体结构揭示,蛋白质形成一个二聚体 β -折叠桶为外表面的识别螺旋提供了骨架;E2-BS 复合物光滑地环绕于 β -折叠桶,识别螺旋包围在大沟中。该模式揭示了一种新的 DNA 结合方式和新的二聚体蛋白形成方式。E2/DBS 复合物的碱基序列特异性是由蛋白质/DNA 直接和水分子介导的相互作用而产生的。E2-DBD(不含靶 DNA)的结构已经确定,其材料正在整理之中。

本文所述的晶体结构研究工作显示了 X-射线晶体学在阐明生命过程的基础——生物大分子相互作用规律的巨大前景。这一新兴学科也为合理设计治疗药物(如结构辅助药物)和诊断试剂提供了重要手段。人们可通过 X-结晶衍射数据和计算机程序处理,把一个分子作为一个计算物,精确地描述其所有的结合位点、范德华力和静电相互作用,从而表达相互作用中的分子行为。

参考文献

- 1 Hegde RS et al. Nature, 1992; 359: 505-512
- 2 Hendrickson WA et al. Science, 1991; 254: 51-58
- 3 Hegde RS et al. J Nucl Med, 1995; 36(Suppl): 25S-27S
- 4 Ringe D. J Nucl Med, 1995; 36(Suppl): 28S-30S
(收稿日期: 1995-12-27)