

酿酒酵母氧化应激系统的结构生物学基础

周丛照

(中国科学技术大学生命科学学院,合肥微尺度物质科学国家实验室,安徽合肥 230027)

摘要:酿酒酵母是目前研究背景最为清楚的单细胞真核生物,迄今已知有78个基因编码的蛋白质直接参与其氧化应激反应.这些蛋白质按照功能可以被分为三大类:感应蛋白、调控蛋白和效应蛋白.我们从效应蛋白出发,沿着硫氧还蛋白系统和谷氧还蛋白系统的电子传递路线,逐一解析了所有关键节点蛋白质的三维结构.结合这些蛋白质的生化性质研究、蛋白质-蛋白质复合物的鉴定和结构解析,以及酵母基因组数据库中日益更新的实验数据,我们已初步建立参与酵母氧化应激反应的效应蛋白在原子分辨率上的相互作用网络.这些研究将为我们理解人类氧化应激反应的作用机理提供重要提示,进而可能用于疾病治疗和抗衰老药物的设计.

关键词:氧化应激;酿酒酵母;晶体结构;电子转移;蛋白质相互作用

中图分类号:Q71 **文献标识码:**A

Structural basis for yeast pathway in response to oxidative stress

ZHOU Cong-zhao

(Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, and School of Life Sciences,
University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular organism with the best research background. To date, there are 78 genes annotated to the term of response to oxidative stress in yeast. The encoded proteins of these genes could be classified into three groups, sensors, regulators and effectors. Taking advantage of the methodology of structural genomics, we started with all of the effectors and have solved all key effectors along the electron transfer pathway of thioredoxin and glutaredoxin systems. Moreover, a series of assays will be set up to identify the potential biochemical activities of the important effectors. Biochemical assays, in combination with protein-protein complex identification and structure solution, and the fast growing information in yeast databases, enable us to remodel a structure-based protein-protein interaction network of effectors in response to oxidative stress. These researches will provide us with some hints to design potential drugs for preventing oxidative stress-related diseases and aging.

Key words: oxidative stress; *Saccharomyces cerevisiae*; crystal structure; electron transfer; protein interaction

收稿日期:2008-06-28; **修回日期:**2008-07-05

基金项目:中国科学院“百人计划”,国家自然科学基金(30470366),国家重点基础研究发展(973)计划(2006CB80650)和国家重大科学研究计划(2006CB910202)资助.

作者简介:周丛照,博士/教授,中国科学院“百人计划”入选者,中国生物化学与分子生物学学会常务理事.1987~1995年就读于中国科学技术大学生物系并先后获学士和硕士学位;1999~2000年作为联合培养博士生在法国巴黎南大学 IGM 研究所学习,2000年获中国科学技术大学生命科学学院博士学位;2000~2003年在法国科研中心及巴黎南大学做博士后研究.主要从事酿酒酵母氧化应激的蛋白质相互作用网络和家蚕丝心蛋白相关基因和蛋白的结构和功能研究.2006年作为首席科学家主持国家重大科学研究计划项目“蛋白质修饰、转运和氧化还原的结构生物学基础”.在 NAR、JBC、Structure 和 Proteins 等杂志发表学术论文 20 余篇.曾获得 1998 年度安徽省自然科学二等奖和 2000 年中法科技交流协会生物技术奖. E-mail: zcz@ustc.edu.cn

0 引言

氧化应激(oxidative stress)是细胞内的氧化还原平衡被打破的一种胁迫.引起氧化应激的原因可以是内源的反应性氧化物(reactive oxygen species, ROS)的大量积累(源自于呼吸作用或脂肪酸氧化等代谢过程),或者外源氧化物的刺激.ROS 包括 H_2O_2 、单态氧(singlet oxygen)、羟自由基(hydroxyl radical)和超氧化物阴离子(superoxide anion)等.氧化应激是导致细胞损伤、衰老和死亡的主要原因之一,具体反映在 DNA 损伤、蛋白质氧化、脂质过氧化等方面.氧化应激在心血管疾病、神经退行性疾病、肺纤维化、癫痫等疾病中扮演重要角色^[1].衰老的自由基学说甚至认为正是由于氧自由基的不断积累而导致了细胞的衰老,在果蝇等模式生物中的研究表明其寿命也与氧化应激有关^[2].因此对氧化应激反应过程中的信号转导和蛋白质相互作用网络的研究将有助于我们对疾病和衰老的理解,并进而为治疗和预防上述疾病和设计抗衰老药物提供理论基础.

1 酿酒酵母氧化应激过程中的信号转导通路

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是最重要的真核模式生物之一,很多重要的功能蛋白与人类的蛋白质具有较高的同源性,因此基于这一简化模式的研究,对于阐明人类对应的反应途径有着重要的方法学与同源提示作用.例如,由 Sch9 控制的酵母寿命调控和应激反应的信号途径与线虫、果蝇和小鼠等真核生物非常相似^[3].迄今为止,共有 78 个基因编码的蛋白质被证实参与酿酒酵母的氧化应激反应(<http://db.yeastgenome.org/>).上述蛋白依其功能可分为三类(图 1):感应蛋白(sensors)、调控蛋白(regulators)和效应蛋白(effectors).感应蛋白主要是一些膜蛋白,包括位于线粒体膜上的 Mcr1 和位于质膜上的 Snq2、Cpd1、Sln1,以及 Sln1 的活化因子 Ssk1.调控蛋白则主要是一些转录因子及其调控蛋白,包括 Yap1 及其结合蛋白 Ybp1、Aft2、Msn2/Msn4 以及 Skn7.效应蛋白则是一些氧化还原蛋白、分子伴侣和一些控制参与氧化应激反应的小分子(如 GSH、NADPH 和谷氨酸等)代谢的蛋白质.它们具体负责清除细胞内的 ROS,以及修复 ROS 引起的蛋白质和 DNA 等大分子的损伤.

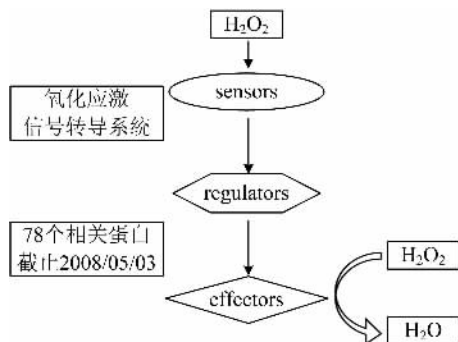


图 1 酿酒酵母氧化应激过程中的信号转导途径
Fig. 1 The signal transduction pathway in response to oxidative stress in the budding yeast

在酵母氧化应激反应中最主要的信号转导途径是经由 Yap1 放大的途径. Yap1 是 AP-1 家族的转录起始因子,在氧化应激时能够激活一系列氧化应激相关基因的转录,例如 TRR1、Trx2、GSH1 和 GLR1 等基因就是由 Yap1 控制. Yap1 缺失株对氧化应激非常敏感,很多改变胞内氧化还原平衡的物质都会影响 Yap1 缺失株的生长. Yap1 的功能发挥依赖于它的细胞定位,其 N 端有核定位序列(NLS),C 端有出核序列(NES).正常情况下,处于还原态的 Yap1 位于细胞质中,一旦受到氧化刺激(例如 H_2O_2),Ybp1 就与 Yap1 形成复合物,Gpx3 催化 Yap1 形成分子内二硫键,入核序列暴露,并启动 Yap1 向核内的转移和富集^[4].氧化应激解除后,大量被表达的 Trx2 会还原 Yap1 分子内的二硫键,使其出核序列重新暴露,在 Crm1 帮助下出核,停止氧化应激相关基因的转录,实现自身的反馈抑制调节^[5].

由于感应蛋白主要位于各种膜系中,而作为调控蛋白的转录因子往往有大量的无规卷曲(coiled-coil)区和很强的 DNA 结合能力,所以对它们三维结构的研究相对较难.为此,我们选取氧化应激过程中的效应蛋白及其相互作用网络作为我们的首批研究对象.这些效应蛋白可以被分为七大类.最主要的两大类蛋白质——谷氧还蛋白系统和硫氧还蛋白系统将在下文详细介绍(图 2).其他的五大类蛋白质包括:与细胞色素相关的氧化还原酶、NADPH 合成和代谢相关的蛋白质、一些分子伴侣、蛋白质甲硫氨酸还原酶以及无法被归类的蛋白质.

无论是硫氧还蛋白系统还是谷氧还蛋白系统,都是以磷酸戊糖途径前两步反应中所产生的 NADPH 为终端电子供体.这两步反应分别由葡萄

糖-6-磷酸脱氢酶 Zwfl (glucose-6-phosphate dehydrogenase)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 Gnd1(6-phosphogluconate dehydrogenase)催化. Gnd1 的晶体结构表明,其 C 端的 α 螺旋不仅有助于稳定二聚体结构,而且对其活性是至关重要的^[6]. 当磷酸戊糖途径所产生的 NADPH 不足时, NADH 可以在 Pos5 的催化作用下被磷酸化而生成 NADPH^[7]. 同时, NADPH 氧化还原酶 Aif1 还能够以 NADPH 或 NADH 为电子供体还原二硫键.

在氧化应激条件下,细胞中的一些蛋白质的甲硫氨酸残基上的硫也可能被氧化,从而导致这些蛋白质的生物学功能丧失. 蛋白质甲硫氨酸-R-氧化物还原酶 Ycl033c 和蛋白质甲硫氨酸-S-氧化物还原酶 Mxr1 可以将这些被氧化的硫还原. Mxr1 和 Ycl033c 均以还原态的硫氧还蛋白作为电子供体,不同的是它们分别特异性地识别 R 型和 S 型的硫氧化物^[8].

迄今为止,在酿酒酵母中已发现有 43 个基因受转录因子 Yap1 调控 (<http://bond.unleashedinformatics.com/>),其中包括已经被鉴定参与氧化应激的 Trx2、Gtt2、Glr1、Lys7 和 Gsh1 等. 随着对 Yap1 调控的其他基因及其表达产物的深入研究,将会有更多参与氧化应激的蛋白质被发现.

2 酿酒酵母的硫氧还蛋白系统

第一大类效应蛋白组成了在进化上高度保守的硫氧还蛋白系统. 该系统包括: 3 种硫氧还蛋白亚型 (Trx1/2/3)、两种硫氧还蛋白还原酶亚型 (Trr1/2)、以硫氧还蛋白为主要电子供体的硫氧还蛋白过氧化物酶 TPX (thioredoxin peroxidase, 如 Ahp1、Dot5、Prx1、Tsa1、Tsa2 等). 还原态的硫氧还蛋白在 TPX 的催化下与 H_2O_2 反应生成水和氧化态的硫氧还蛋白. 这些氧化态的硫氧还蛋白又可以在硫氧还蛋白还原酶 (Trr1 和 Trr2) 的作用下被还原而循环使用 (以 NADPH 作为电子供体). 静息态时 Trx2 在胞内浓度最高,其表达受转录因子 Yap1 和 Skn7 的控制. 根据在胞内的定位, Trx1/2/3 被划归到两个不同的 TRX 系统. Trx1 和 Trx2 定位于胞质,它们和同样定位于胞质的 Trr1 组成胞质硫氧还蛋白系统. Trx3 定位于线粒体,它和 Trr2 组成线粒体硫氧还蛋白系统. 两个 TRX 系统之间功能互不重叠,不可互相取代^[9]. 同时,这两个系统又都和

GSH(谷胱甘肽)系统有千丝万缕的联系. 敲除和突变实验证明,破坏 TRX 系统或 GSH 系统中的任意一个,虽然酿酒酵母胞内被氧化物质的量会增高,但是酵母仍然可以生长. 如果同时破坏两个系统,氧化应激反应将会导致酵母死亡^[10]. 此外,线粒体 TRX 系统不单具有清除自由基的功能,还是保证酿酒酵母进行正常呼吸作用所必须的^[11]. 目前已知的酿酒酵母 TRX 与人源 TRX 的功能非常接近. 除了没有免疫调节功能外,不论是为某些代谢途径提供还原力、抗氧化,还是参与转录因子调控,都能找到酿酒酵母 TRX 的类似报道^[12].

酵母基因组共编码三个不同的硫氧还蛋白 (Trx1/2/3),它们在一级结构水平上具有 43%~76% 的同源性. 它们与谷氧还蛋白以及蛋白质二硫键异构酶均属于 TRX 折叠类型 (TRX fold). 图 2 所示的是酿酒酵母 Trx2 氧化态的晶体结构. TRX 在所有生物中都具有非常相似的折叠模式,由 4 个 α 螺旋环绕在 5 个 β 折叠板两侧,形成三明治式的结构. TRX 的活性位点具有保守的 WCGPC 序列,它突出在蛋白表面 (图 2). 当将氧化型的 Trx2 结构和人类 Trx1 结构比较时发现活性中心的一些关键氨基酸残基构象的改变,尤其是处于 WCGPC 模序中的 Trp30,它相对人类 Trx1 旋转了 90° 角,这可能跟它识别相应的蛋白质底物以及二聚体的形成有关. 当把 Trx2 二聚体和人类 Trx1 二聚体比对时,发现人类 Trx1 二聚体的两个活性中心由于分子间 Cys72 形成的二硫键而被隐藏在二聚体的作用界面上,而酵母 Trx2 二聚体的两个活性中心一个在二聚体结合界面上,另一个却暴露在外面. 我们推测这种现象或许是进化选择的结果,以利于防止活性中心被进一步氧化^[13].

Trx3 氧化态与 Trx3 还原态在活性位点区域呈现出不同的构象 (图 3),其中最明显的残基是 Trp31. 氧化态的 Trp 31 的吡咯环通过失去与 Asp60 的氢键而远离活性中心,插入相邻亚基的疏水口袋中. 它和 Trx3 中另一个非活性中心的半胱氨酸残基 Cys69 形成氢键. 在人类 Trx1 中由同样的半胱氨酸处于 Cys69 的位置,它被证明能够被硝基化^[14,15],而 Tryptophan 也和硝基反应相关^[16]. 我们推测该构象可能暗示了 Trx3 与其底物之间转硝基反应的机制 (待发表).

硫氧还蛋白过氧化物酶 (TPX) 是一类从细菌到哺乳动物中都广泛存在的蛋白. 它以 TRX 为电

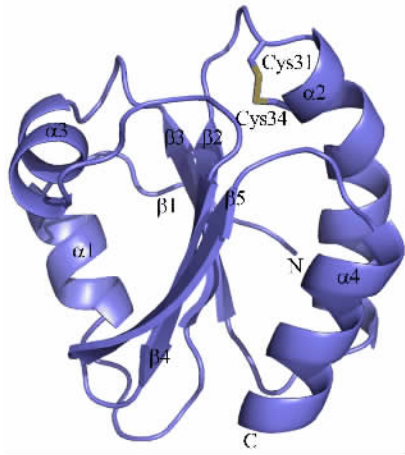


图 2 氧化态的硫氧还蛋白 Trx2 的晶体结构

Fig. 2 Crystal structure of oxidized thioredoxin Trx2

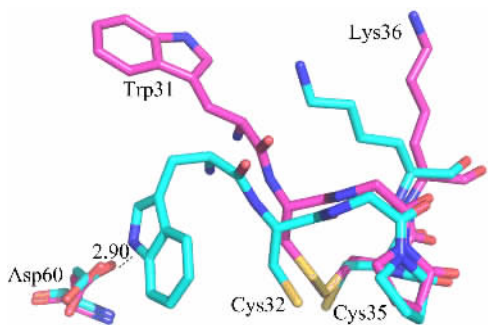


图 3 氧化态(紫红色)和还原态(蓝色)的硫氧还蛋白 Trx3 在活性中心附近区域的构象变化

Fig. 3 Conformational changes at Trx3 active site region from oxidized (in violet) to reduced (in blue) form

子供体,还原自身代谢产生或者是外来的 ROS. 目前已知的酿酒酵母中 TPX 有 Tsa1/2、Ahp1、Prx1、Gpx1/2/3 等. 这类蛋白结构保守,全部属于 TRX fold-like 家族,活性中心附近存在一到两个保守的 Cys. 定点突变实验证实,如果有两个保守的 Cys,则靠近 N 端的 Cys 是 TPX 发挥过氧化物酶的功能关键氨基酸残基,称为 C_P ;靠近 C 端的 Cys 被称为 C_R ,不能直接去还原 ROS,它的功能是接受来自 TRX 的电子,去还原被 ROS 氧化成 Cys-S-OH 的 C_P . 如果只有一个保守的 Cys,则该位点既可以攻击 ROS,又可以被 TRX 攻击,所以 C_P 和 C_R 实际上代表的是同一个 Cys. 根据保守 Cys 的数量及其在反应中二硫键的形成方式,TPX 被分为三类:第一类是典型的 2-Cys-TPX,具有两个 Cys,两个分子首尾相接形成二体,反应中将底物还原后,一个分子的 C_P 会和另一个分子的 C_R 形成分子间的二硫键. 这一类包括 Tsa1 和 Tsa2. 第二类是非典型的 2-Cys-

TPX,同样具有两个 Cys,但却是以单体的形式存在,被氧化后自身的 C_P 和 C_R 形成分子内二硫键,如 Gpx1/2/3. 最后一类是 1-Cys-TPX,只具有 N 端保守的 Cys,目前在酿酒酵母中发现的只有 Prx1 属于 1-Cys-TPX^[17,18].

Tsa1 在细胞内广泛存在,是一个标准的 2-Cys-TPX,具有清除反应性氧、氮、硫自由基的功能,最近的报道显示它还具有分子伴侣的功能. 二体的 Tsa1 可以清除自由基,当用热激或 H_2O_2 处理酿酒酵母后,Tsa1 组成环状十聚体,保护其他蛋白不发生变性,甚至还可以形成球状超级分子伴侣. 聚合状态的改变主要是由于 Cys48 被氧化后引起 Tsa1 的构象变化而导致的^[19]. Tsa2 氨基酸序列与 Tsa1 很相近,也同样有清除 ROS 的功能. 但与其他 TPX 敲除株不同,Tsa2 敲除株存在生长缓慢,并有大量细胞滞留 G_1 期的现象,这可能是由于 Tsa2 作为一个调控子参与了细胞周期的控制^[20].

Gpx3 分类上属于非典型的 2-Cys-TPX,是一个很特殊的 TPX 蛋白:第一,它具有经典 TPX 酶的活性,主要接受 TRX 系统传来的电子(而不是曾经认为的 GSH 系统),清除氧化应激反应中产生的 ROS^[21]. 第二,它还具有监测胞内 H_2O_2 浓度变化的功能,可以将 H_2O_2 升高的信号传递给转录因子 Yap1 而使其构象发生变化,导致 Yap1 入核并引发氧化应激相关基因的转录^[21]. 第三,Gpx3 有结合 Mxr1 的能力. 正常情况下,Gpx3 与 Mxr1 靠分子间二硫键结合. 用 H_2O_2 处理后,分子间二硫键断裂,Mxr1 被释放,说明 Gpx3 可能参与到了 Mxr1 的活性调节过程. 晶体结构显示,Gpx3 的活性中心具有非常高的柔性,可能与 Trx2 或其他蛋白质结合有关(待发表).

3 酿酒酵母的谷氧还蛋白系统

第二大类效应蛋白组成了酿酒酵母中与硫氧还蛋白系统平行和互补的谷氧还蛋白系统. 该系统包括:8 种谷氧还蛋白亚型(Grx1-Grx8)、以谷胱甘肽为主要电子供体的谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,如 Gpx2 和 Gpx3)、谷胱甘肽合成酶 Gsh1 和 Gsh2,以及谷胱甘肽还原酶 Glr1. γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 Gsh1 和谷胱甘肽合成酶 Gsh2 利用 Glu、Cys 和 Gly 合成谷胱甘肽,以保证细胞内稳定的谷胱甘肽浓度. 这些谷胱甘肽在谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx1/2、Grx1/2)的催化下与

H_2O_2 进行酶促反应将其还原为 H_2O 。被氧化的谷胱甘肽则由谷胱甘肽还原酶 Grx1 以 NADPH 作为电子供体而还原从而被循环使用。

谷氧还蛋白 Grxs 在酿酒酵母中共有 8 个拷贝, 其中 Grx1 和 Grx2 在一级结构上具有 64% 的同源性, 活性区序列为 TYCPYC。两者均具有谷胱甘肽转移酶 (glutathione transferase)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase) 和巯基-二硫键交换中间体 (thiol-disulfide exchange intermediate) 等三种活性。Grx3、Grx4 和 Grx5 的活性中心则只含有 1 个 Cys(三者在一级结构水平上具有 44%~64% 的同源性), 活性中心模序为 PKCGFSR, 它们均只有巯基-二硫键交换中间体活性^[22]。

酿酒酵母 Grx1 定位于细胞质与细胞核内, 而 Grx2 则位于胞液与线粒体中。虽然 Grx1 与 Grx2 之间存在着很高的同源性, 但是 Grx1 缺陷型突变体对于超氧型阴离子诱发的氧化胁迫敏感, 而 Grx2 缺陷型突变体则对于过氧化氢敏感。这表明两者在酿酒酵母细胞的正常生长和胁迫条件中起不同的作用。我们已解析氧化态和谷胱甘肽化的 Grx1 的晶体结构, 以及氧化态和还原态的 Grx2 晶体结构。它们均以四条混合型的 β 折叠组成核心, 外围由五段 α 螺旋环绕, 属于典型的谷氧还蛋白折叠类型 (Trx-like fold) (图 4)。Grx1 与谷胱甘肽的结合主要依赖于活性中心的关键氨基酸残基和谷胱甘肽形成的氢键网络^[23]。Asn88 和 Asp89 两个残基与谷胱甘肽的 γ -谷氨酰末端形成氢键, Val75 的氮原子和羰基氧原子分别与谷胱甘肽中的半胱氨酰的羰基氧原子和氮原子形成氢键, Lys24 与 Gln63 则与谷胱甘肽的甘氨酸末端羧基的两个氧原子之间形成氢键 (图 5)。

通过比较氧化态与谷胱甘肽化的 Grx1 的结构, 可以看到一些关键氨基酸残基构象的变化。例如: Thr25 和 Tyr26 的主链在谷胱甘肽化后出现了较大位移, Thr25 的羰基氧原子从内向外翻转, $C\alpha$ 移动 0.92 Å, 同时 Tyr26 的羰基氧原子也略向外翻转, 其侧链的羟基移动了 12.22 Å, 并形成了一个水分子介导的与 GSH 甘氨酸末端羧基氧原子的氢键。Tyr29 的侧链也在结合 GSH 后移动了 1.61 Å, His31 的侧链也由向溶液一侧翻转到 Cys27 与 Pro28 的上方, 并与 Thr25 的羰基氧原子形成氢键。可见这些氨基酸残基在 Grx1 结合 GSH 或者二硫键底物的过程中起到重要的作用。

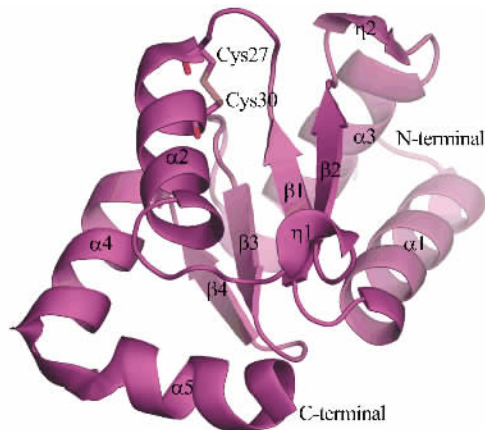
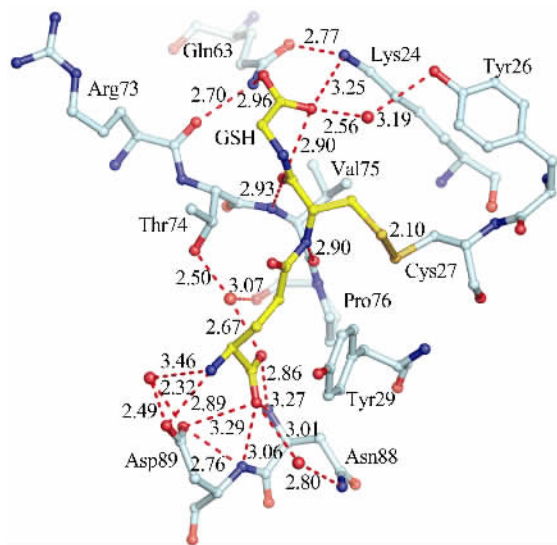


图 4 氧化态的谷氧还蛋白 Grx1 结构

Fig. 4 Crystal structure of oxidized glutaredoxin Grx1



GSH is colored in yellow, and the related residues of Grx1 in blue.

图 5 GSH 与 Grx1 的相互作用

Fig. 5 Interaction between GSH and Grx1

Grx2 与 Grx1 的结构相似, 两者氧化型晶体结构主链原子比对的 RMSD 为 0.589 Å。Grx1 和 Grx2 的 GSH 结合位点的残基高度保守, 只有 Grx1 的 Asp89 在 Grx2 中被 Ser123 取代。ITC 实验结果显示 Grx1 和 Grx2 对于 GSH 的解离常数分别为 1.34 μ M 和 23.4 μ M。可能是由于这两个残基的不同, 导致了 Grx1 和 Grx2 对 GSH 的 γ -谷氨酰端结合的能力不同, 进而影响了 GSH 的结合能力和催化活性(待发表)。

Grx5 是存在于线粒体中的一种 1-Cys 谷氧还蛋白, 在 GSH 浓度较低时具有谷氧还蛋白活性, 而当 GSH 浓度较高时则形成铁硫簇^[24]。我们解析了 Grx5 氧化态的晶体结构, 并制备了 Grx5 在过量的

GSH 和充足的铁离子存在时形成的 2Fe-2S 型的铁硫簇蛋白及其初步晶体. 此外, 还获得了 Grx6 的晶体和 Grx8 的初步核磁共振主链结构.

4 结语和展望

在硫氧还蛋白系统中, 我们已解析酿酒酵母 Trx 所有三个不同亚型的三维结构, 并对其结构和功能在进化水平上进行了系统的分析. 同时, 还解析了 Trx3-Trx2 复合物的晶体结构, 发现了一个与以前报道不同的 Trx 结合位点. 获得了 Trx3-Prx1、Trx2-Tsa2、Trx2-Met16 等稳定复合物的晶体. 这一系列复合物的结构研究将使我们了解在硫氧还蛋白系统中, 电子由最初的供体 NADPH 经由 Trx 传递给其下游的靶蛋白的分子机制.

在谷氧还蛋白系统中, 我们解析了 Grx1、Grx2 和 Grx5 单体的晶体结构, 发现 Grx1 和 Grx2 对 GSH 结合能力的差异是源自于一个单个残基的变异. Grx5 单体的晶体结构及其铁硫簇样品的制备和结构解析将为我们进一步了解这一双功能蛋白提供结构生物学基础. 在已有的 5 个 Grx (Grx1~5) 之外, 我们对新鉴定的 3 种 Grx (Grx6~8) 也展开了系统研究, 目前已获得了 Grx6 的晶体, 并收集到 Grx8 的双标核磁共振波谱学数据. 这些谷氧还蛋白的结构解析将加深我们对谷氧还蛋白在进化过程中的多样化和功能精细分工的理解. 加上谷胱甘肽还原酶 Glr1 的晶体结构^[25], 我们已初步勾画出谷氧还蛋白系统中原子分辨率水平上的电子传递途径. 在氧化还原平衡与蛋白质修饰方面, 我们解析了 Urm1 同二聚体的高分辨率的晶体结构^[26], 以及目前发现的唯一的 Urm1 的底物蛋白——Ahp1 的三维结构. Ahp1 与其电子供体 Trx2 的复合物已经被纯化, Ahp1-Urm1 的复合物正在制备之中. 这两个复合物结构的解析, 将提供氧化还原平衡过程中的电子传递与 Urm1 之间最直观的结构生物学依据.

酵母的 TRX 系统在分子生物学和细胞生物学水平上已经有了较详尽的研究背景, 但是在 TRX 与其底物蛋白相互作用方面的研究还远远不够. 在上述单一蛋白质三维结构的基础上, 我们将进一步鉴定一些新的硫氧还蛋白的底物蛋白, 通过解析一组具有一定代表性的硫氧还蛋白与其底物蛋白的复合物的三维结构, 来系统分析二者的相互作用界面, 以期总结出硫氧还蛋白识别其底物蛋白的结构生物

学基础和共同特征.

此外, 我们还将对氧化应激过程中的一些具有代表性的转录因子和感应蛋白进行深入研究. 如 Yap1 的 N 端和 C 端 DNA 结合区域之间的相互作用关系, Yap1 与 Gpx3 和 Trx2 之间的相互作用界面等.

在效应蛋白之间的电子传递网络的结构基础上, 结合从感应蛋白到调控蛋白和效应蛋白的信号转导途径的研究, 我们将可能绘制出氧化应激通路在原子分辨率水平上的全景图. 这将有助于指导我们在人类等高等生物中进行相关电子传递信号转导通路的研究, 并为设计氧化应激相关疾病的药物提供理论指导.

参考文献 (References)

- [1] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. *Science*, 1985, 235: 529-531.
- [2] Wang M C, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila* [J]. *Dev Cell*, 2003, 5: 811-816.
- [3] Fabrizio P, Pozza F, Pletcher S D, et al. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast [J]. *Science*, 2001, 292: 288-290.
- [4] Veal E A, Ross S J, Malakasi P, et al. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 30 896-30 904.
- [5] Okazaki S, Tachibana T, Naganuma A, et al. Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal [J]. *Mol Cell*, 2007, 27(4): 675-688.
- [6] He W W, Wang Y, Liu W, et al. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1 [J]. *BMC Struct Biol*, 2007, 7: 38.
- [7] Strand M K, Stuart G R, Longley M J, et al. POS5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA [J]. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(4): 809-820.
- [8] Kryukov G V, Kumar R A, Koc A, et al. Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4 245-4 250.
- [9] Trotter E W, Grant C M. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory

- systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(2): 392-400.
- [10] Draculic T, Dawes I W, Grant C M. A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(5):1 167-1 174.
- [11] Pedrajas J R, Kosmidou E, Miranda-Vizuete A, et al. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(10):6 366-6 373.
- [12] Lillig C H, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules; from biology to health and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(1):25-47.
- [13] Bao R, Chen Y, Tang Y J, et al. Crystal structure of the yeast cytoplasmic thioredoxin Trx2 [J]. *Proteins*, 2007, 66(1): 246-249.
- [14] Weichsel A, Brailey J L, Montfort W R. Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin [J]. *Biochem*, 2007, 46: 219-227.
- [15] Sengupta R, Ryter S W, Zuckerbraun B S, et al. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols [J]. *Biochem*, 2007, 46: 8 472-8 483.
- [16] Salavej P, Spalteholz H, Arnhold J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40: 516-525.
- [17] Rhee S G, Chae H Z, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(12):1 543-1 552.
- [18] Wood Z A, Schr der E, Robin Harris J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(1):32-40.
- [19] Jang H H, Lee K O, Chi Y H, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function [J]. *Cell*, 2004, 117(5):625-635.
- [20] Park S G, Cha M K, Jeong W, et al. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8):5 723-5 732.
- [21] Delaunay A, Pflieger D, Barrault M B, et al. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation [J]. *Cell*, 2002, 111(4):471-481.
- [22] Grant C M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions [J]. *Mol Microbiol*, 2001, 39(3): 533-541.
- [23] Yu J, Zhang N N, Yin P D, et al. Glutathionylation-triggered conformational changes of glutaredoxin Grx1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proteins*, 2008(in press).
- [24] Rodríguez-Manzanque M T, Tamarit J, Bellí G, et al. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(4):1 109-1 121.
- [25] Yu J, Zhou C Z. Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proteins*, 2007, 68(4):972-979.
- [26] Yu J, Zhou C Z. Crystal structure of the dimeric Urm1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proteins*, 2008, 71(2):1 050-1 055.