

# HOẠT TÍNH TRAO ĐỔI MẠCH DNA VÀ BẮT CẶP DNA CỦA CshA TỪ VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PHỤ THUỘC C-TERMINUS

PHẠM TẤN VIỆT, NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH

<sup>1</sup>*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, nguyenthidieuhanh@iuh.edu.vn*

**Tóm tắt.** Protein DEAD-box CshA có vai trò quan trọng trong các hoạt động biểu hiện gen của tế bào. Chức năng của các domain trong protein DEAD-box cần được nghiên cứu để hiểu rõ hơn hoạt động của protein này. Trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp CshA và CshA- $\Delta$ CTE (loại bỏ C-terminus) đã được tinh sạch và kiểm tra các hoạt tính về khả năng hình thành liên kết với cơ chất DNA mạch đơn và mạch đôi. Các hoạt tính trao đổi mạch DNA và bắt cặp DNA trong các điều kiện có và không có sự hiện diện của ATP cũng được xác định. CshA đã thể hiện hoạt tính liên kết với cơ chất DNA theo phương thức không phụ thuộc vào ATP, trong khi CshA- $\Delta$ CTE thể hiện ái lực liên kết thấp và không chặt chẽ với cơ chất mạch đơn và mạch đôi DNA. Sự loại bỏ C-terminus của CshA đã làm mất hoạt tính trao đổi mạch DNA và hoạt tính bắt cặp DNA của CshA. Như vậy, C-terminus đóng vai trò quan trọng trong việc gia tăng ái lực liên kết với cơ chất DNA và đảm bảo hoạt tính trao đổi mạch DNA cũng như hoạt tính bắt cặp DNA của CshA.

**Từ khóa.** Protein DEAD-box, CshA, liên kết DNA, trao đổi mạch DNA, bắt cặp DNA.

## DNA STRAND EXCHANGE AND DNA ANNEALING ACTIVITIES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CSHA DEPEND ON C-TERMINUS

**Abstract.** DEAD-box protein CshA plays an important role in cellular gene expression activities. The function of domains in the DEAD-box protein needs to be studied to get more insights into the function of this protein. In this study, recombinant CshA and CshA- $\Delta$ CTE (C-terminus truncated CshA) were purified and tested the DNA binding activity with single-stranded DNA and double-stranded DNA substrates. DNA exchange and DNA annealing activities with and without the present of ATP were determined. We have shown that CshA displayed DNA binding activity in an ATP-independent manner, while CshA- $\Delta$ CTE exhibited low and non-tight binding affinity with both single and double-stranded DNA substrates. The loss of C-terminus resulted in absence of DNA exchange activity and CshA DNA annealing activity. Thus, C-terminus plays an important role in increasing DNA binding affinity and DNA exchange activity as well as DNA annealing activity of CshA.

**Key words.** DEAD-box Protein, CshA, DNA binding, DNA strand exchange, DNA annealing.

### 1. GIỚI THIỆU

Protein DEAD-box là họ protein lớn được xếp vào nhóm RNA helicase với chứa chín motif được bảo tồn có vai trò trong việc hình thành các liên kết với RNA, hoạt tính ATPase phụ thuộc RNA, hoạt tính tháo xoắn RNA phụ thuộc ATP và tham gia vào hầu hết các quá trình hoạt động RNA, bao gồm phiên mã, ghép nối, vận chuyển RNA, sinh tổng hợp ribosome, dịch mã, phân hủy RNA [1-4]. Các nghiên cứu về chức năng của protein DEAD-box đã được thực hiện nhiều với các ghi nhận về hoạt tính sinh học cũng như chức năng trong hoạt động sống của tế bào. Protein DEAD-box CYT-19 của *Neurospora crassa* và Mss116p của *Saccharomyces cerevisiae* được biết đến là các RNA chaperon thúc đẩy sự phân cắt intron nhóm I và II trong ty thể và kích hoạt sự dịch mã RNA [5, 6]. DEAD-box CshA và RhlB được xác định là thành phần RNA helicase trong phức hợp phân hủy RNA ở vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* và có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự phiên mã chuyên biệt để đáp ứng các điều kiện môi trường [7-12]. Nghiên cứu về cấu trúc CshA đã cho thấy cơ chế hoạt động của protein này trên

cơ chất RNA với sự hình thành cấu trúc dimer trong liên kết với RNA và thúc đẩy hoạt tính tháo xoắn RNA phụ thuộc ATP, đồng thời, phần C-terminus của CshA cũng được xác định có chức năng gia tăng ái lực trong liên kết với cơ chất RNA [13].

Bên cạnh chức năng tham gia vào các cơ chế hoạt động của RNA, protein DEAD-box còn có vai trò trong hoạt động của DNA. Dbp9p, một protein DEAD-box có vai trò trong các quá trình sinh học của ribosome trong nấm men, đã thể hiện hoạt tính tháo xoắn trên DNA [14], protein DDX43 cũng thể hiện hoạt tính tháo xoắn trên cả hai cơ chất DNA và RNA [15], protein DEAD-box DDX1 được tìm thấy trong nhân và thường xuất hiện tại các vị trí DNA mạch đôi bị gãy vỡ trong giai đoạn đầu sửa chữa sai hỏng trên DNA [16]. Các protein khác như DHH1 và MPH1 có trong nấm men đã cho thấy vai trò trong hệ thống sửa chữa các sai hỏng trên bộ gen DNA trong quá trình sao chép [17, 18]. CshA từ *S. aureus* cũng thể hiện hoạt tính trên cơ chất DNA với khả năng liên kết cơ chất DNA mạch đơn và mạch đôi với ái lực khác nhau. Các hoạt tính trao đổi mạch DNA và bắt cặp DNA để hình thành sản phẩm là các DNA mạch đôi theo phương thức không phụ thuộc ATP của CshA đã được xác nhận trong nghiên cứu trước đây [19]. Tuy nhiên, cơ chế hoạt động của protein này trên DNA ở mức phân tử vẫn chưa được làm rõ, do đó, việc nghiên cứu chức năng sinh học của các domain trên trình tự acid amin của protein với cơ chất DNA giúp làm sáng tỏ cơ chế hoạt động của protein này trong tế bào.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng và tinh sạch protein CshA với việc loại bỏ phần C-terminus trong trình tự và so sánh các đặc tính về khả năng liên kết với cơ chất DNA, hoạt tính trao đổi mạch, bắt cặp DNA của protein CshA đủ trình tự và CshA không có C-terminus. Các tính chất sinh học xác định được khi không có sự hiện diện của domain C-terminus trong trình tự sẽ tiên đoán được chức năng của domain này và giúp làm rõ hoạt động cũng như vai trò của CshA trong các hoạt động của DNA trong tế bào.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein DEAD-box CshA và CshA loại bỏ C-terminus (CshA- $\Delta$ CTE)

Protein DEAD-box CshA từ vi khuẩn *S. aureus* Mu50 (NCBI accession number NP\_372605.1) có chiều dài 506 acid amin được tạo dòng và biểu hiện theo phương pháp đã được trình bày trong nghiên cứu trước đây [19]. Cặp mồi chuyên biệt cho CshA được thiết kế theo trình tự 5'-CATATGCAAATT TTAAGAAGACTAGGG-3' và 5'-CTCGAGTTTTTGATGGTCAGCAAATG-3' tương ứng cho mỗi xuôi và mỗi ngược. Tương tự như vậy, đoạn gen mã hóa cho protein CshA loại bỏ phần C-terminus chứa trình tự acid amin 1-367 (CshA- $\Delta$ CTE) được khuếch đại bằng phản ứng PCR (polymerase chain reaction) với cặp mồi chuyên biệt theo trình tự 5'-CATATGCAAATTTTAAAGAAGACTAGGG-3' cho mỗi xuôi và 5'-CTCGAGACGAAGTGCCTCATTCT-3' cho mỗi ngược. Đoạn gen sau khi PCR được chèn vào plasmid pET-22b (Novagen, Darmstadt, Germany). Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen, Darmstadt, Germany). Tế bào *E. coli* chứa plasmid có gen được nuôi trong môi trường LB (Luria broth) có bổ sung ampicillin (50  $\mu$ g/mL) tại nhiệt độ 37°C và lắc 180 vòng/phút. Chất cảm ứng IPTG (isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside) được thêm vào môi trường nuôi cấy với nồng độ cuối đạt 0,5mM để biểu hiện protein khi mật độ quang ở bước sóng 600 nm đạt 0,6 và tiếp tục nuôi ở 16°C trong 4 giờ. Các tế bào sau nuôi cấy được thu nhận bằng ly tâm. Protein tái tổ hợp CshA và CshA- $\Delta$ CTE được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare, Sweden), sau đó tiếp tục tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel Superdex 75 gel filtration columns (GE Healthcare, Sweden) như được mô tả trong các nghiên cứu trước. Kết quả tinh sạch được kiểm tra trên gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) [20].

#### 2.1.2. Các cơ chất mạch đơn DNA và mạch đôi DNA

Các phân đoạn DNA được tổng hợp bằng phương pháp hóa học và cung cấp từ công ty Cosmo Genetech (Seoul, Korea), trình tự của các phân đoạn DNA được trình bày trong bảng 1. Các phân đoạn 1 và 3 được đánh dấu với đồng vị phóng xạ <sup>32</sup>P tại đầu 5' bằng enzyme T4 polynucleotide kinase (10 U, Takara, Tokyo, Japan) và [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) như đã

được trình bày trong nghiên cứu trước. Các phân đoạn đã được đánh dấu được tinh sạch bằng phương pháp tách chiết phenol/chloroform và kết tủa bằng cồn lạnh [19]. Các cơ chất mạch đôi DNA được chuẩn bị bằng cách cho phản ứng bắt cặp giữa hai mạch có trình tự bổ sung tương ứng và được đốt nóng tại 95°C trong 5 phút, sau đó làm lạnh từ từ tại nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các cơ chất mạch đôi DNA có cấu trúc đầu bằng (blunt end dsDNA), đuôi 3' (3' tail dsDNA), đuôi 5' (5' tail dsDNA) và chĩa ba (forked dsDNA) được chuẩn bị bằng cách cho phản ứng giữa các phân đoạn 1+2, 3+2, 1+4, và 3+4 tương ứng.

Bảng 1. Trình tự các phân đoạn DNA được sử dụng trong nghiên cứu

Số thứ tự các phân đoạn (chiều dài nucleotide)	Trình tự (5'→3')
1* (35)	TTGACTTCATGACCTATAGTGAGTCGTATTAGTCC
2 (35)	GGACTAATACGACTCACTATAGGTCATGAAGTCAA
3* (45)	TTGACTTCATGACCTATAGTGAGTCGTATTAGTCCTTTTTTTTTTT
4 (50)	TTTTTTTTTTTTTTGGACTAATACGACTCACTATAGGTCATGAAGTCAA

(\* ) Phân đoạn DNA được đánh dấu tại đầu 5'-<sup>32</sup>P

## 2.2. Phương pháp

### 2.2.1. Phương pháp xác định khả năng kết nối cơ chất DNA

Khả năng kết nối với các cơ chất mạch đơn và mạch đôi DNA của CshA và CshA-ΔCTE được xác định bằng phương pháp EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) trên gel agarose 1%. Phản ứng được thực hiện trong môi trường chứa 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,15 mg/mL BSA với 5 μM các loại cơ chất mạch đơn và mạch đôi DNA không được đánh dấu 5'-<sup>32</sup>P và 5 μM CshA/CshA-ΔCTE. 4 mM ATP được thêm vào phản ứng để xác định nhu cầu năng lượng của CshA/CshA-ΔCTE trong hoạt tính liên kết DNA. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được phân tách trên gel agarose 1% và nhận diện khả năng kết nối cơ chất bằng cách nhuộm với SYBR Gold trong 30 phút, sau đó quan sát kết quả dưới đèn UV. [21]

### 2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính trao đổi mạch DNA

Hoạt tính chuyển mạch DNA được kiểm tra trong môi trường phản ứng có chứa 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 2 mM DTT, và 0,15 mg/mL BSA. Phản ứng được thực hiện trong điều kiện có hoặc không có 4 mM ATP trong các khoảng thời gian khác nhau được chú thích trong các hình ảnh. Các cơ chất mạch đôi DNA (10 nM) có cấu trúc khác nhau đã được đánh dấu 5'-<sup>32</sup>P được cho phản ứng với CshA và CshA-ΔCTE (1 μM) trong môi trường có chứa phân đoạn DNA mạch đơn (100 nM) không đánh dấu tương ứng (phân đoạn 1 cho phản ứng của cơ chất mạch đôi DNA đầu bằng và mạch đôi DNA đuôi 3'; phân đoạn 3 cho phản ứng của cơ chất mạch đôi DNA đuôi 5' và mạch đôi chĩa ba). Các phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong thời gian tương ứng và được ngừng bằng dung dịch quenching buffer chứa 100 mM EDTA pH 8,0, 0,4% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 0,1% bromophenol blue, 0,1% xylene cyanol. Hỗn hợp sau phản ứng được kiểm tra bằng sự điện di trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (non-denaturing polyacrylamide gel-PAGE) và nhận diện các tín hiệu thông qua thiết bị PhosphorImager (Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA). Đối chứng âm (-) được thực hiện tương tự trong phản ứng không có protein. Đối chứng dương (+) được thực hiện bằng cách đốt nóng dung dịch phản ứng tại 95°C trong 5 phút [19]

### 2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính bắt cặp DNA

Hoạt tính bắt cặp DNA của protein tái tổ hợp CshA và CshA-ΔCTE được xác định trong môi trường chứa 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,5 mg/mL BSA, 0,1 nM phân đoạn mạch đơn DNA được đánh dấu 5'-<sup>32</sup>P (phân đoạn 1), và 0,25 nM phân đoạn mạch đơn DNA không đánh dấu đồng vị phospho (phân đoạn 4). Các phản ứng được thực hiện trong điều kiện có hoặc không có 0,1 μM CshA/CshA-ΔCTE trong các khoảng thời gian 1, 2, 5, 10 phút. Sau thời gian phản ứng, dung dịch

quenching buffer như trong phản ứng trao đổi mạch DNA được thêm vào để ngừng phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được phân tách trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE) và sản phẩm bắt cặp được dò tìm bằng thiết bị PhosphorImager (Packard Instrument Co.). [19]

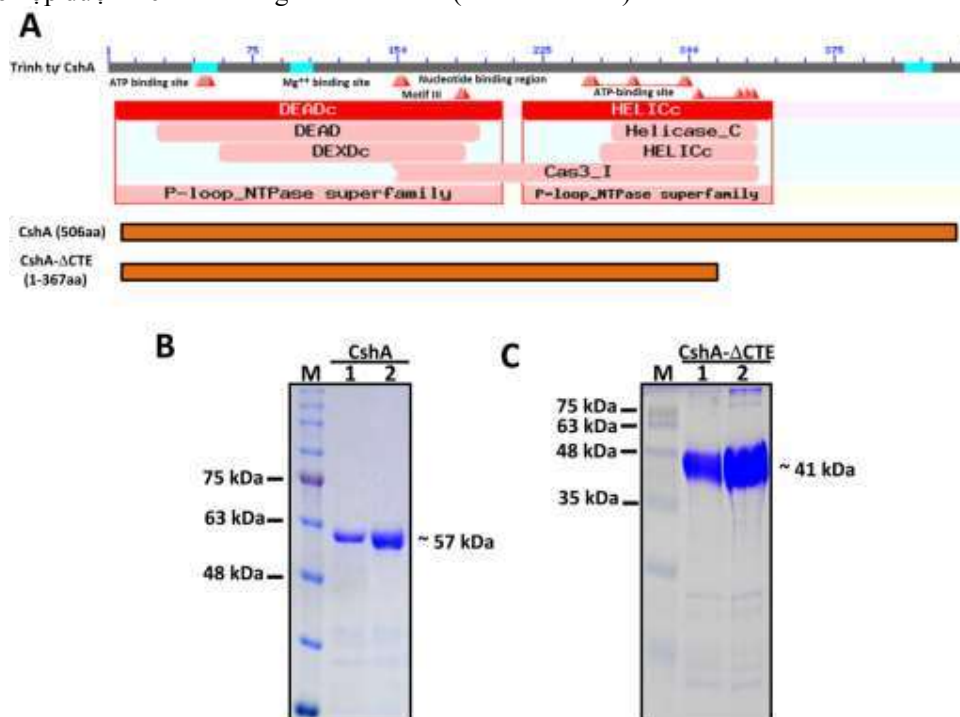
#### 2.2.4. Phương pháp phân tích và so sánh cấu trúc không gian 3 chiều của protein

Trình tự acid amin của DEAD-box CshA được so sánh với trình tự các protein khác bằng chương trình NCBI Protein Blast và công cụ ESPript để xác định độ tương đồng cũng như các vị trí bảo tồn tương ứng. Cấu trúc không gian ba chiều của protein cũng được dự đoán bằng chương trình dự đoán cấu trúc Swiss-model trong website [www.expasy.org](http://www.expasy.org) [22-26]. Tiếp theo, cấu trúc không gian ba chiều dự đoán được từ Swiss-model sẽ được so sánh với cấu trúc không gian các protein tương ứng thông qua chương trình PyMOL, từ đó đề xuất vùng hoạt động của protein CshA [27].

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tinh sạch protein DEAD-box CshA và CshA- $\Delta$ CTE

Protein DEAD-box CshA của vi khuẩn *S. aureus* Mu50 được dự đoán thuộc nhóm enzyme RNA helicase. Các trình tự bảo tồn trên gen cho thấy chức năng tiềm tàng của protein này. So sánh với các trình tự protein khác trên NCBI, vùng N-terminus (acid amin 1-212) của protein DEAD-box CshA chứa các trình tự bảo tồn DEAD-box có chức năng liên kết với ATP, liên kết  $Mg^{2+}$  và kết nối với nucleotide, trong khi trình tự bảo tồn HELIC tiếp theo (acid amin 213-367) dự đoán chứa hoạt tính helicase và kết nối ATP, nhưng vùng C-terminus (acid amin 368-506) không cho thấy hoạt tính tiềm năng nào (hình 1A). Để xác định vai trò vùng C-terminus của protein DEAD-box CshA, protein CshA và CshA loại bỏ vùng C-terminus được tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch như được trình bày phía trên. Kết quả tinh sạch các protein tái tổ hợp được kiểm tra trên gel SDS-PAGE (hình 1B và 1C).

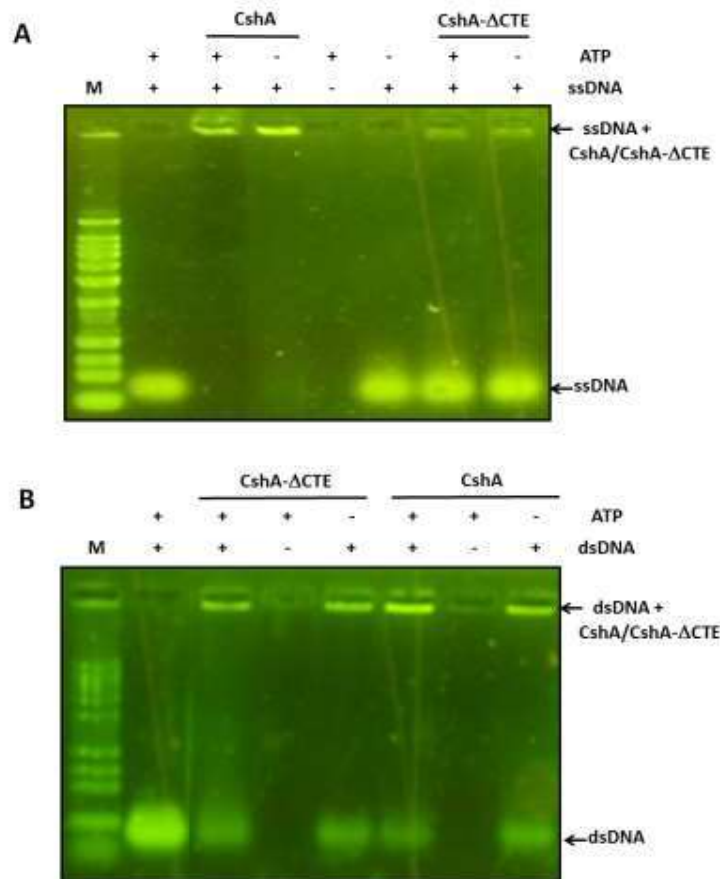


Hình 1: Kết quả tinh sạch protein DEAD-box CshA và CshA loại bỏ C-terminus (CshA- $\Delta$ CTE) của vi khuẩn *S. aureus*. (A) Dự đoán cấu trúc chức năng dựa trên trình tự acid amin của CshA và xác định phần C-terminus của CshA. (B) và (C) Kết quả điện di trên sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 12% của CshA và CshA- $\Delta$ CTE sau khi được tinh sạch bằng sắc ký  $Ni^{2+}$  và sắc ký lọc gel; Lane 1-2 là các phân đoạn sau tinh sạch. M là thang chuẩn protein.

CshA với đầy đủ trình tự 506 acid amin trọng lượng tương ứng khoảng 57 kDa và CshA- $\Delta$ CTE sau khi boại bỏ phần C-terminus còn 367 acid amin thì có trọng lượng khoảng 41 kDa. Kết quả sau khi tạo dòng, tinh sạch và kiểm tra trên gel SDS-PAGE, protein sau khi tinh sạch thể hiện đúng kích thước mong đợi cho thấy sản phẩm protein tái tổ hợp được tạo thành là các protein cần thiết. Quan sát các vạch điện di trên gel SDS-PAGE, sự hiện diện của các vạch ngoài mong đợi là không đáng kể, kiểm tra bằng phần mềm gel analyzer, kết quả cho thấy độ tinh sạch trong sản phẩm protein CshA đạt trên 98%, và độ tinh sạch của CshA- $\Delta$ CTE đạt trên 96%. Protein tinh sạch không chứa các tạp chất sẽ hạn chế được các hoạt tính không mong muốn có thể xuất hiện trong các phản ứng nghiên cứu. Với độ tinh sạch hơn 96%, các protein tái tổ hợp CshA và CshA- $\Delta$ CTE được sử dụng cho các nghiên cứu các hoạt tính trên acid nucleic tiếp theo.

### 3.2. CshA và CshA- $\Delta$ CTE có khả năng liên kết với các cơ chất DNA khác nhau

CshA thuộc nhóm protein DEAD-box với chức năng dự đoán là enzyme RNA helicase, trong nghiên cứu trước, hoạt tính trao đổi mạch DNA và bắt cặp DNA của enzyme CshA đã được ghi nhận [19]. Việc liên kết với cơ chất là các acid nucleic là hoạt tính đầu tiên cần thiết cho các chức năng tiếp theo của enzyme. Do đó, khả năng liên kết với các cơ chất DNA đã được kiểm tra theo phương pháp EMSA. Sau thời gian cho phản ứng với cơ chất, sự hình thành phức hợp giữa enzyme và cơ chất DNA được kiểm tra trên gel agarose 1% (hình 2).



Hình 2: Khả năng liên kết với các loại cơ chất DNA mạch đơn (A) và mạch đôi chứa ba DNA (B) của CshA và CshA- $\Delta$ CTE thể hiện qua sự điện di trên gel agarose 1%. M là thang chuẩn DNA; ssDNA là DNA mạch đơn; dsDNA là DNA mạch đôi.

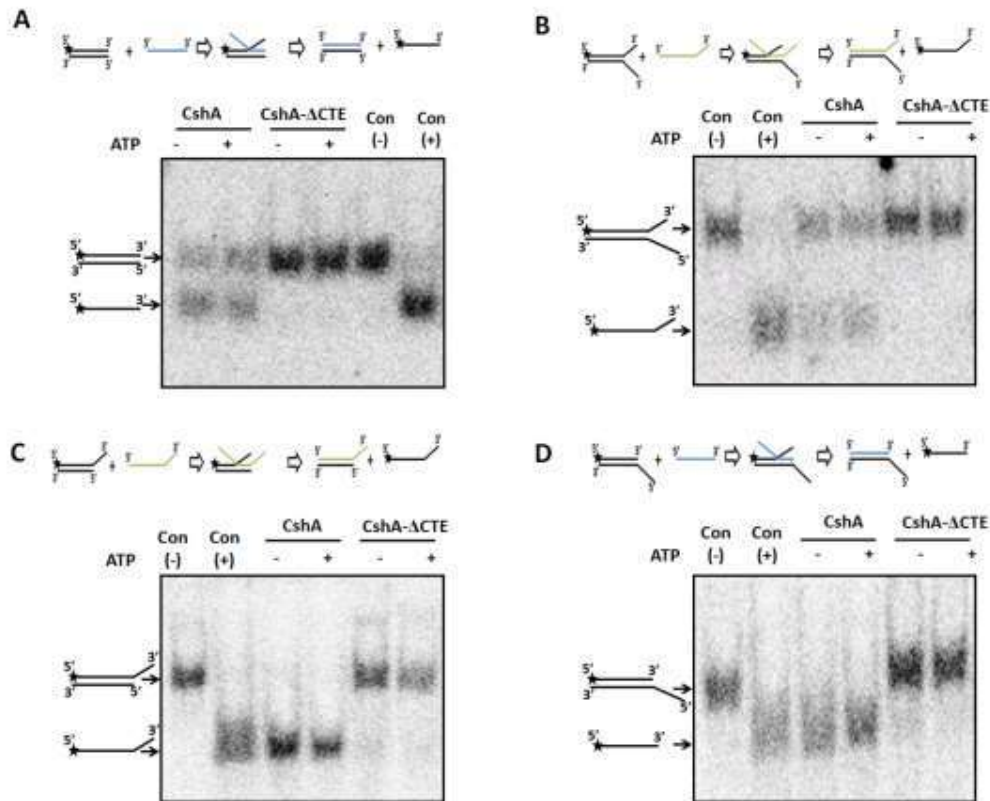
Phức hợp được tạo thành giữa liên kết của protein và DNA có trọng lượng phân tử cao hơn và tốc độ di chuyển sẽ chậm hơn so với cơ chất DNA ban đầu, so sánh tốc độ di chuyển của DNA trong quá trình

điện di sẽ xác định được khả năng liên kết DNA của protein. Kết quả điện di trên gel agarose trong phản ứng kiểm tra khả năng liên kết với cơ chất mạch đơn DNA của CshA và CshA- $\Delta$ CTE cho thấy sau khi loại bỏ phần C-terminus, khả năng liên kết với cơ chất mạch đơn giảm rõ rệt với vạch xuất hiện có cường độ phát sáng không cao, các cơ chất DNA không hình thành liên kết được quan sát thấy phía dưới của gel điện di, trong khi CshA với đủ trình tự acid amin thể hiện khả năng liên kết triệt để với phức hợp hình thành rõ ràng và không quan sát thấy cơ chất mạch đơn DNA còn lại sau phản ứng (hình 2A). Bên cạnh đó, sự hiện diện của ATP không ảnh hưởng đến hoạt tính liên kết cơ chất mạch đơn DNA của CshA/CshA- $\Delta$ CTE với các vạch tương ứng cho phức hợp cơ chất-DNA không có sự thay đổi trong các điều kiện có hoặc không có ATP. Quan sát khả năng liên kết với các cơ chất DNA mạch đôi, kết quả điện di cho thấy protein CshA và CshA- $\Delta$ CTE đều có khả năng hình thành liên kết tạo phức hợp enzyme-DNA. Tuy nhiên, sự hình thành phức hợp enzyme-DNA không chặt chẽ nên vạch tương ứng thể hiện theo vết dài, đồng thời không có sự khác biệt giữa phản ứng có sự hiện diện của ATP hoặc không có ATP (hình 2B). Kết quả này cũng phù hợp như kết quả đã được báo cáo trong nghiên cứu trước với khả năng liên kết cơ chất RNA không phụ thuộc vào ATP [13] và các hoạt tính trao đổi mạch DNA và bắt cặp DNA không phụ thuộc vào năng lượng ATP của enzyme CshA [19].

Quan sát trình tự acid amin của CshA, vị trí của vùng liên kết với các nucleotide được dự đoán ở vùng acid amin 150-200 (hình 1A), do đó việc loại bỏ phần C-terminus có thể không ảnh hưởng đến hoạt tính liên kết với các cơ chất acid nucleic của CshA. Tuy nhiên, sự giảm ái lực liên kết trong các điều kiện thử nghiệm với mạch đơn và mạch đôi chứa ba DNA của CshA- $\Delta$ CTE cho thấy khả năng liên kết yếu hoặc độ bền của phức hợp liên kết không cao khi thiếu phần C-terminus trong trình tự protein. Trong nghiên cứu về cấu trúc của CshA của *Geobacillus stearothermophilus*, nhóm tác giả Jennifer Huen đã kiểm tra vai trò C-terminus lên khả năng kết nối của CshA lên các cơ chất RNA mạch đơn và RNA mạch đôi, kết quả cho thấy khả năng kết nối của CshA giảm mạnh khi loại bỏ phần C-terminus trong cấu trúc với hằng số liên kết của CshA và của CshA- $\Delta$ CTE là 0,2 và 13,68  $\mu$ M đối với cơ chất RNA mạch đôi, trong trường hợp cơ chất mạch đơn, hằng số liên kết là 0,36 và 28,05  $\mu$ M cho CshA và cho CshA- $\Delta$ CTE, thể hiện sự tương tác của C-terminus trong sự hình thành liên kết chặt chẽ với cơ chất DNA [13]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu về khả năng liên kết với cơ chất RNA của DEAD-box Mss116p của *Saccharomyces cerevisiae*, phần C-terminus của protein này không ảnh hưởng đến sự liên kết với các cơ chất RNA dù là mạch đơn hay mạch đôi nhưng có vai trò quan trọng trong việc kích hoạt quá trình dịch mã và ghép nối RNA [28], nghiên cứu với Hera-RecA cũng thu được kết quả tương tự với hoạt tính liên kết với RNA mạch đôi không phụ thuộc vào C-terminus [29]. Vai trò C-terminus của các protein DEAD-box trong việc liên kết với các acid nucleic cũng được tổng hợp trong nghiên cứu của Pavan Umate và cho thấy các domain của vùng C-terminus như Helic C trong họ DEAD/H có vai trò trong liên kết RNA và tháo xoắn, domain RQC và HRDC của RecQ có vai trò trong việc hình thành liên kết Holliday trong sửa chữa DNA, domain HA2 của DHX9/DHX36 cũng được dự đoán có vai trò trong việc liên kết với các acid nucleic [30-32].

### 3.3. CshA không thể hiện hoạt tính trao đổi mạch DNA khi loại bỏ phần C-terminus

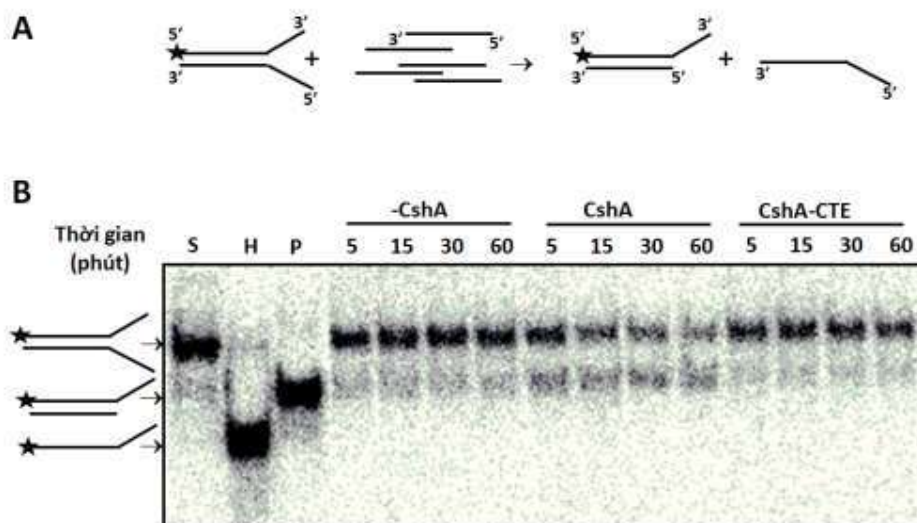
Khả năng kết nối với cơ chất DNA mạch đôi của CshA không bị ảnh hưởng bởi phần C-terminus đã được xác định, liệu rằng phần C-terminus có ảnh hưởng đến các hoạt tính trao đổi mạch DNA và bắt cặp mạch DNA của CshA. Để kiểm tra khả năng này, CshA và CshA- $\Delta$ CTE đã được kiểm tra trong phản ứng thí nghiệm có chứa các loại cơ chất mạch đôi DNA có cấu trúc khác nhau với sự hiện diện hoặc không của 4 mM ATP trong thời gian 10 phút. Tương ứng với từng loại cơ chất mạch đôi có đánh dấu đồng vị  $5'$ - $^{32}$ P, mạch đơn không đánh dấu được bổ sung vào với lượng thừa (cao gấp 10 lần cơ chất mạch đôi) nhằm quan sát được sản phẩm phản ứng là các mạch đơn được đánh dấu sau khi chuyển mạch. Con đường phản ứng chuyển mạch được mô tả trong sơ đồ trên các hình ảnh thể hiện kết quả điện di nhận được trong từng cơ chất phản ứng cụ thể (hình 3).



Hình 3: Hoạt tính chuyển mạch DNA của CshA và CshA- $\Delta$ CTE trên các cơ chất DNA có cấu trúc khác nhau; mạch đôi DNA đầu bằng - blunt end dsDNA (A), mạch đôi DNA chứa ba - forked dsDNA (B), mạch đôi DNA đuôi 3' - 3' tail dsDNA (C) và mạch đôi DNA đuôi 5' - 5' tail dsDNA (D). Phản ứng được thực hiện trong 10 phút, kết quả được phân tích trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE). Dấu sao cho thấy vị trí đánh dấu đồng vị 5'-32P trên mạch DNA. Con (-) là đối chứng âm được thực hiện trong phản ứng không có protein; Con (+) là đối chứng dương được thực hiện bằng cách đốt nóng phản ứng ở 95°C trong điều kiện phản ứng tương tự.

Hoạt tính trao đổi mạch của CshA từ *S. aureus* không phụ thuộc vào năng lượng ATP, khác biệt với hoạt tính tách mạch helicase là cần phải cung cấp năng lượng cho phản ứng xảy ra. Mặc dù CshA- $\Delta$ CTE có khả năng liên kết với cơ chất mạch đôi DNA nhưng kết quả kiểm tra sau khi điện di cho thấy CshA- $\Delta$ CTE không thể hiện hoạt tính trao đổi mạch sau thời gian phản ứng là 10 phút trên các cơ chất khác nhau, điều này cho thấy phần C-terminus có vai trò quan trọng trong xúc tác phản ứng trao đổi mạch của CshA.

Trong thí nghiệm khảo sát khả năng trao đổi mạch để hình thành sản phẩm là các mạch đôi DNA như trong sơ đồ thể hiện trong hình 4A, sự trao đổi mạch sau phản ứng sẽ hình thành sản phẩm là các DNA mạch đôi đuôi 3' từ cơ chất ban đầu là DNA mạch đôi chứa ba. Phản ứng được kiểm tra trong các khoảng thời gian khác nhau từ 5 cho đến 60 phút và kiểm tra trên gel không biến tính polyacrylamide (hình 4B).



Hình 4: Hoạt tính trao đổi mạch DNA của CshA và CshA- $\Delta$ CTE trên cơ chất DNA mạch đôi DNA chia ba theo thời gian. (A) Sơ đồ phản ứng của hoạt tính chuyển mạch DNA trên cơ chất mạch đôi DNA chia ba; (B) Sản phẩm phản ứng được phân tích trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE). Dấu sao cho thấy vị trí đánh dấu đồng vị phóng xạ trên mạch DNA. S là cơ chất phản ứng; H là phân đoạn mạch đơn được đánh dấu trong cơ chất; P là sản phẩm mong đợi của hoạt tính chuyển mạch sau phản ứng.

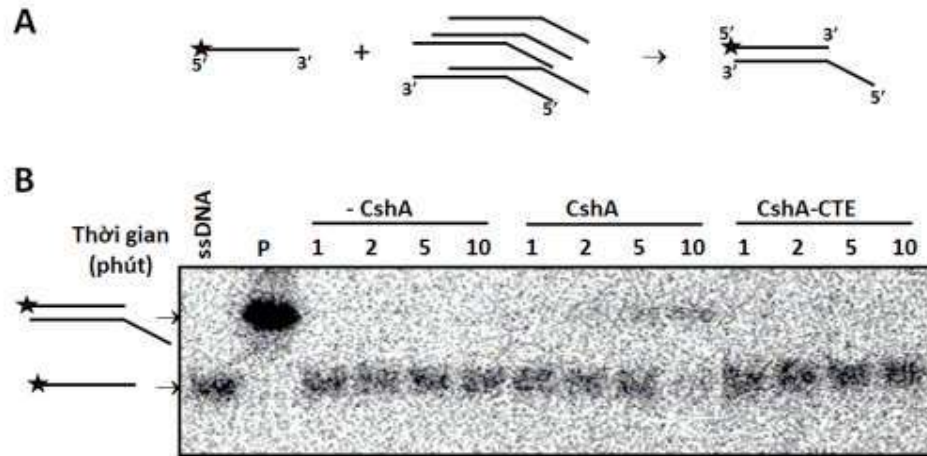
Sau các khoảng thời gian phản ứng (5-60 phút), sản phẩm trao đổi mạch được quan sát thấy trong các thí nghiệm có sự hiện diện của CshA. Trong các thí nghiệm với CshA- $\Delta$ CTE hoặc không có enzyme, sản phẩm phản ứng không có sự thay đổi so với cơ chất ban đầu. Sản phẩm là các mạch đơn không được quan sát thấy sau phản ứng, cho thấy không có sự hình thành loại sản phẩm này và chứng minh được đặc tính trao đổi mạch xảy ra đồng thời, không có sự hiện diện của hoạt tính tháo xoắn. Mặc dù thời gian phản ứng được gia tăng nhưng kết quả không có sự khác biệt, điều này khẳng định CshA mất hoạt tính trao đổi mạch khi không có sự hiện diện của C-terminus trong trình tự acid amin. Hoạt tính trao đổi mạch của protein DEAD-box có vai trò quan trọng trong việc hình thành liên kết nối Holliday trong sự sửa chữa các sai hỏng trên DNA trong quá trình sao chép [33]. Trong nghiên cứu của Michael D.Huber và cộng sự, domain RQC và HRDC trong C-terminus của protein DEAD-box RecQ có chứa vị trí chuyên biệt cho hình thành liên kết Holliday, do đó sự loại bỏ C-terminus trong trình tự của CshA có thể đã dẫn đến việc đánh mất hoạt tính trao đổi mạch của DEAD-box CshA này [32].

#### 3.4. CshA không thể hiện hoạt tính bắt cặp DNA khi loại bỏ phần C-terminus

Ngoài hoạt tính trao đổi mạch, Csh A còn được xác định có hoạt tính bắt cặp DNA, hình thành sản phẩm là các DNA mạch đôi từ các mạch đơn có trình tự bổ sung. Để xác định vai trò của phần C-terminal, hoạt tính bắt cặp của CshA- $\Delta$ CTE được kiểm tra trong điều kiện chứa cơ chất là các mạch đơn phân đoạn 1 và phân đoạn 3 có trình tự bổ sung. Thí nghiệm được thực hiện trong các khoảng thời gian khác nhau và phân tích sản phẩm trên gel không biến tính polyacrylamide (hình 5). Sau thời gian phản ứng, sản phẩm mạch đôi DNA được quan sát thấy trong các phản ứng có sự hiện diện của CshA với đủ trình tự, sự vắng mặt enzyme hay thiếu phần C-terminus không quan sát thấy sản phẩm mạch đôi DNA hay sản phẩm hình thành không đáng kể sau thời gian phản ứng. Sự mất hoặc giảm hoạt tính bắt cặp khi không có C-terminus có thể được giải thích do ái lực liên kết của CshA- $\Delta$ CTE trên cơ chất là các DNA mạch đơn yếu như đã quan sát thấy trong các thí nghiệm về khả năng kết nối (hình 2A), sự khó khăn trong việc hình thành các liên kết với cơ chất sẽ hạn chế việc thúc đẩy phản ứng bắt cặp xảy ra. Do đó, CshA đã không thể hiện khả năng bắt cặp DNA khi mất đoạn C-terminus trong trình tự. Ngoài ra, trong nghiên cứu về hoạt tính bắt cặp của Mss116p, nhóm tác giả Georg Mohr đã quan sát thấy sự giảm đáng kể hoạt tính bắt cặp của Mss116p khi loại bỏ phần C-terminus với hằng số tốc độ phản ứng là  $16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

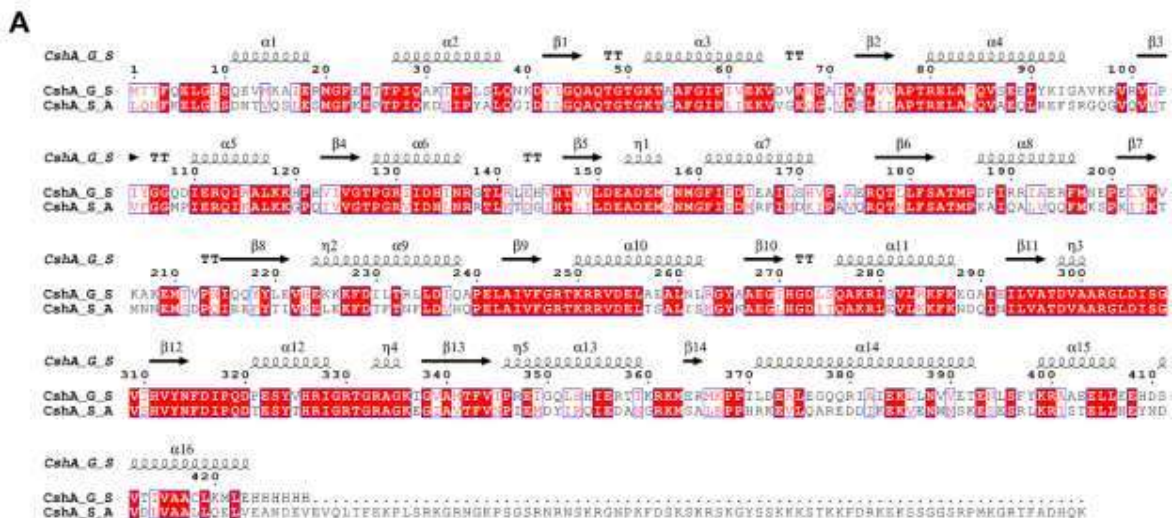


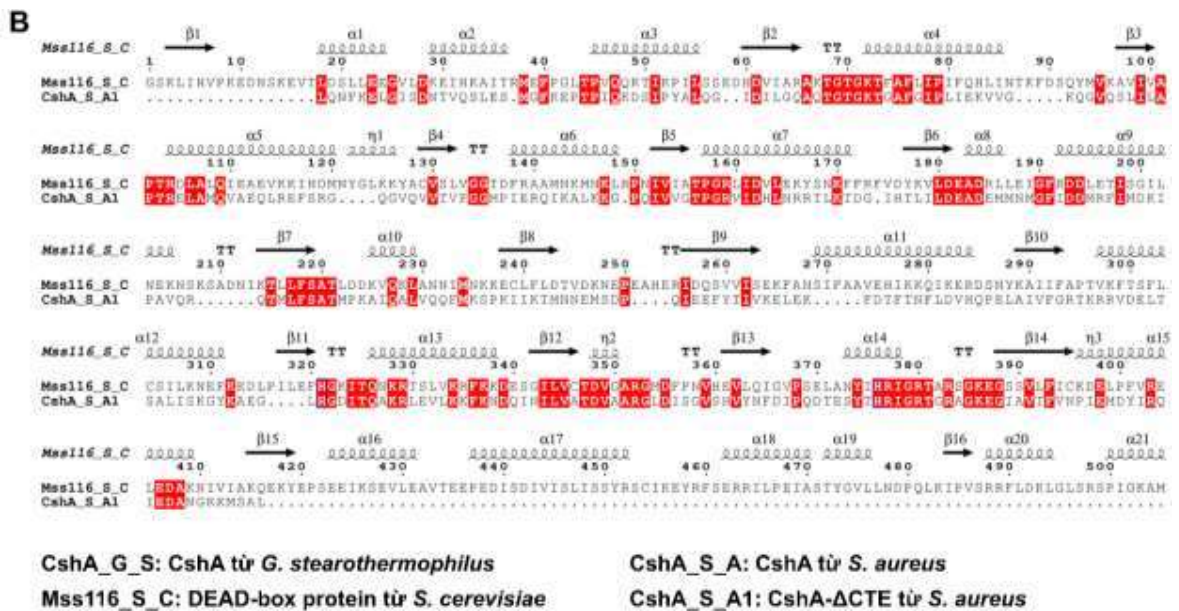
$^1\text{min}^{-1}$  cho Mss116 và  $8,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  cho Mss116p loại bỏ C-terminus, kết quả cho thấy phần C-terminus tối đa hóa hoạt tính bắt cặp của Mss116p [28].



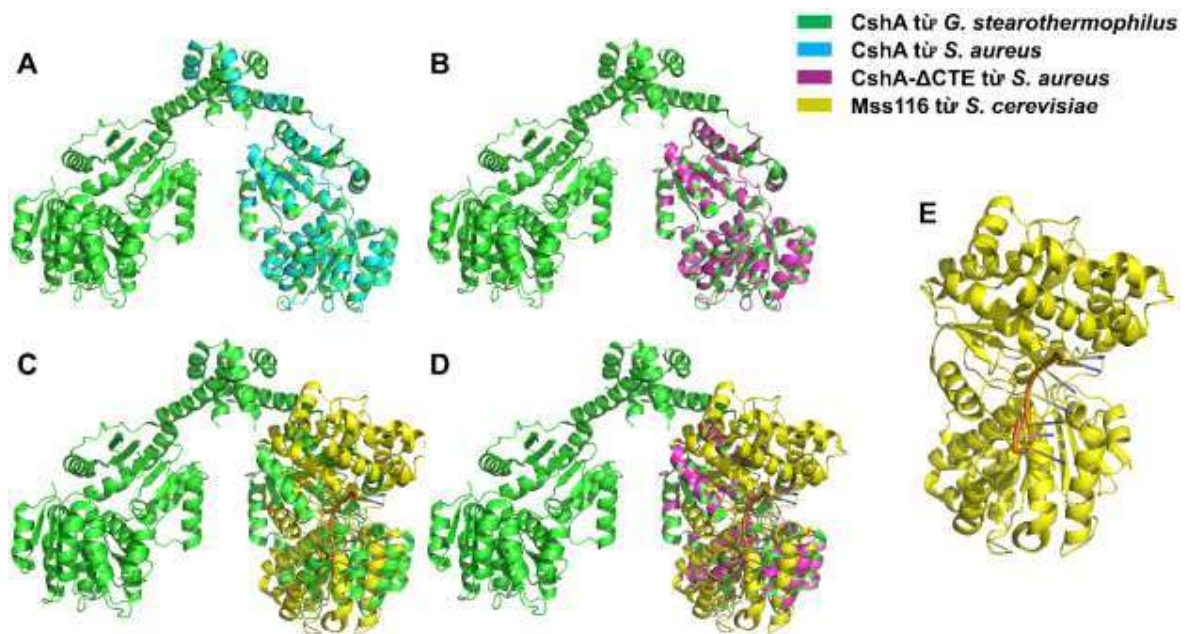
Hình 5: Hoạt tính bắt cặp các mạch đơn DNA tạo sản phẩm mạch đôi DNA của CshA và CshA- $\Delta$ CTE theo thời gian. (A) Sơ đồ phản ứng của hoạt tính bắt cặp DNA để hình thành sản phẩm mạch đôi DNA đuôi 5'; (B) Sản phẩm phản ứng sau thời gian ủ khác nhau được phân tích trên gel polyacrylamide không biến tính 15% (PAGE). Dấu sao cho thấy vị trí đánh dấu đồng vị phóng xạ trên mạch DNA. P là sản phẩm mong đợi của hoạt tính bắt cặp DNA.

Chương trình NCBI Protein Blast (tập trung vào việc so sánh các vị trí bảo tồn) được sử dụng để so sánh trình tự acid amin của CshA từ *S. aureus* với trình tự acid amin của các DEAD-box protein khác. Kết quả cho thấy trình tự acid amin của CshA từ *S. aureus* tương đồng cao với trình tự acid amin của CshA từ *Geobacillus stearothermophilus* (56,03%). Đồng thời, chúng tôi cũng xác định sự tương đồng của trình tự acid amin mất C-terminus của CshA từ *S. aureus* với các trình tự acid amin khác trên ngân hàng dữ liệu của NCBI, kết quả cho thấy trình tự acid amin này tương đồng cao với Mss116 – một DEAD-box protein khác từ *Saccharomyces cerevisiae* (33,66%). Kết quả phân tích trên công cụ ESPript cho thấy các đoạn acid amin bảo tồn trên CshA của *S. aureus* và *G. stearothermophilus* có độ trùng lặp cao (hình 6A), kết quả tương tự khi phân tích sự tương đồng của trình tự mất C-terminal của CshA từ *S. aureus* và Mss116 từ *S. cerevisiae* (hình 6B). [27]





Hình 6: Mức độ tương đồng về trình tự acid amin của CshA từ *G. stearothermophilus* và *S. aureus* (A) và mức độ tương đồng về trình tự acid amin của Mss116 từ *S. cerevisiae* và CshA mất C-terminus từ *S. aureus* (B).



Hình 7: (A) Sự tương đồng về cấu trúc giữa CshA từ *G. stearothermophilus* và CshA từ *S. aureus*. (B) Sự tương đồng về cấu trúc giữa CshA từ *G. stearothermophilus* và CshA mất đoạn C-terminus từ *S. aureus*. (C) Sự tương đồng về cấu trúc giữa CshA từ *G. stearothermophilus* và Mss116 từ *S. cerevisiae*. (D) Sự tương đồng về cấu trúc giữa CshA từ *G. stearothermophilus*, CshA mất đoạn C-terminus từ *S. aureus* và Mss116 từ *S. cerevisiae*. (E) Cấu trúc không gian của Mss116 từ *S. cerevisiae* với sự hiện diện của cơ chất trong trung tâm hoạt động. [13, 34]

Cấu trúc không gian 3 chiều của phân tử CshA và phân tử CshA mất đoạn C-terminus từ *S. aureus* được xây dựng theo chương trình dự đoán cấu trúc Swiss-model [22-26]. Cấu trúc không gian dự đoán của phân tử CshA và phân tử CshA mất đoạn C-terminus từ *S. aureus* có độ tương đồng cao với cấu trúc không gian của CshA từ *G. stearothermophilus* (PDB ID: 5ivl) (hình 7A, 7B). So sánh cấu trúc không

gian của Mss116 từ *S. cerevisiae* (PDB ID: 4tyw) (hình 7E) với các cấu trúc không gian nêu trên, có thể thấy cho thấy trung tâm hoạt động của CshA hình thành ở phần còn lại của CshA (hình 7C, 7D). Căn cứ trên cấu trúc không gian giả định của CshA, sự loại bỏ C-terminus có thể sẽ ức chế sự hình thành cấu trúc dimer cần thiết cho các hoạt động xúc tác phản ứng trên cơ chất acid nucleic (hình 7D) dẫn đến việc vắng mặt của các hoạt tính trao đổi mạch và bắt cặp DNA. Như vậy, mặc dù C-terminus không chứa các motif cần thiết cho việc hình thành liên kết với cơ chất acid nucleic nhưng có vai trò quan trọng trong việc gia tăng ái lực liên kết, hình thành các dimer và thúc đẩy các phản ứng sinh học của CshA [13, 34].

#### 4. KẾT LUẬN

Protein DEAD-box CshA thuộc họ RNA helicase có vai trò quan trọng trong nhiều hoạt động của sự biểu hiện gen như phiên mã, dịch mã, ghép nối RNA, sửa chữa DNA, hoạt động của các chaperon [1]. Vai trò của các domain trong trình tự acid amin của protein DEAD-box có vai trò quan trọng trong các chức năng của chúng, việc nghiên cứu chức năng của các domain sẽ góp phần hiểu rõ hơn hoạt động của protein trong tế bào. Hoạt tính trao đổi mạch DNA cũng như hoạt tính bắt cặp DNA của CshA đã được xác định trong nghiên cứu trước [19]. Để xác định chức năng của C-terminus trong trình tự CshA, protein tái tổ hợp CshA và CshA loại bỏ C-terminus đã được tạo dòng và biểu hiện, kết quả tinh sạch protein đạt hơn 96%. Các hoạt tính về sự hình thành liên kết với cơ chất DNA đã được kiểm tra và cho thấy sự giảm ái lực liên kết khi không có C-terminus trong trình tự. Ngoài ra, hoạt tính trao đổi mạch DNA và hoạt tính bắt cặp DNA của CshA đã không được quan sát thấy trong các thí nghiệm khi thiếu C-terminus. Dựa trên các kết quả thu được, C-terminus đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành liên kết chặt chẽ với các cơ chất DNA và tham gia vào hoạt tính trao đổi mạch DNA cũng như hoạt tính bắt cặp DNA của CshA.

#### LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Nucleic Acid Biochemistry và phòng thí nghiệm Global, đại học Konkuk, Seoul, Hàn Quốc. Do đó, tôi xin chân thành cảm ơn giáo sư Kang Lin-Woo và giáo sư Kim Dong-Eun, đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jarmoskaite I., and Russell R., RNA helicase proteins as chaperones and remodelers. *Annual Review of Biochemistry*, 2014. 83: p. 697–725.
2. Linder P., Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(15): p. 4168-80.
3. Rocak S., Linder P., DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(3): p. 232-41.
4. de la Cruz J., Kressler D., and Linder P., Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci*, 1999. 24(5): p. 192-8.
5. Mohr S., Stryker J.M., Lambowitz A.M., A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell*, 2002. 109: p. 109:769–779.
6. Huang H.R., Rowe C.E., Mohr S., Jiang Y., Lambowitz A.M., Perlman P.S., The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005. 102: p. 163–168.
7. Roux C.M., DeMuth J.P., and Dunman P.M., Characterization of components of the *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex. *J Bacteriol*, 2011. 193(19): p. 5520-6.
8. Jankowsky E., *Methods in Enzymology- Volumn 511: RNA Helicase*. Academic Press, USA, 2012: p. 369-381.
9. Giraudy C., Hausmann S., Lemeille S., Prados J., Redder P., Linder P., The C-terminal region of the RNA helicase CshA is required for the interaction with the degradosome and turnover of bulk RNA in the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*. *RNA Biology*, 2015. 12(6): p. 658-673.

10. Kaberdin V.R., Blasi U., Bacterial helicases in post-transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 2013. 1829: p. 878-883.
11. Laalami S., Zig L., and Putzer H., Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cell Mol. Life Sci.* , 2014. 71: p. 1799–1828.
12. Oun S., Redder P., Didier J.P., Francois P., Corvaglia A.R., Buttazzoni E., Giraud C., Girard M., Schrenzel J., and Linder P., The CshA DEAD box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. *RNA Biology*, 2013. 10: p. 157–165.
13. Huen J., Lin C.L., Golzarroshan B., Yi W.L., Yang W.Z., Yuan H.S., Structural Insights into a Unique Dimeric DEAD-Box Helicase CshA that Promotes RNA Decay. *Cell Press*, 2017. 25: p. 469–481.
14. Kikuma T., Ohtsu M., Utsugi T., Koga S., Okuhana K., Eki T., Fujimori F., Murakami Y., Dbp9p, a member of the DEAD box protein family, exhibits DNA helicase activity. *J Biol Chem*, 2004. 279(20): p. 20692-8.
15. Talwar T., Vidhyasagar V., Qing J., Guo M., Kariem A., Lu Y., Singh R.S., Lukong K.E., Wu Y., The DEAD-box protein DDX43 (HAGE) is a dual RNA-DNA helicase and has a K-homology domain required for full nucleic acid unwinding activity. *J Biol Chem*, 2017. 292(25): p. 10429–10443.
16. Li L., Monckton E.A., and Godbout R., A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(20): p. 6413-25.
17. Schurer K.A., Rudolph C., Ulrich H.D., Kramer W., Yeast MPH1 gene functions in an error-free DNA damage bypass pathway that requires genes from Homologous recombination, but not from postreplicative repair. *Genetics*, 2004. 166(4): p. 1673-86.
18. Bergkessel M., and Reese J.C., An essential role for the *Saccharomyces cerevisiae* DEAD-box helicase DHH1 in G1/S DNA-damage checkpoint recovery. *Genetics*, 2004. 167(1): p. 21-33.
19. Hanh Thi Dieu N., Ngoc An N.-A.N., Gia-Buu Tran, Tan-Viet Pham, The DEAD-box protein CshA in *Staphylococcus aureus* contains ATP-independent DNA strand annealing and exchange activities. *Journal of Sciences and Technology-Industrial University in Ho Chi Minh City*, 2019. (in press).
20. Lee S.Y., Jung H.Y., Kim T.O., Im D.W., You K.Y., Back J.M., Kim Y., Kim H.J., Shin W., Heo Y.S., Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the N-terminal domain of DEAD-box RNA helicase from *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010. 66(Pt 12): p. 1674-6.
21. Hellman L.M., and Fried M.G., Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2007. 2(8): p. 1849-61.
22. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 2018. 46(W1): p. W296-W303.
23. Bienert S., Waterhouse A., de Beer T.A.P., Tauriello G., Studer G., Bordoli L., Schwede T., The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 2017. 45: p. D313-D319
24. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T., Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 2009. 30: p. S162-S173.
25. Benkert P., Biasini M., Schwede T., Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 2011. 27: p. 343-350.
26. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. , Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* 2017. 7(10480).
27. Xavier Robert P.G., Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(W1): p. W320–W324.

28. Mohr G., Del Campo M., Mohr S., Yang Q., Jia H., Jankowsky E., Lambowitz A.M., Function of the C-terminal Domain of the DEAD-Box Protein Mss116p Analyzed In Vivo and In Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 2008. 375(5): p. 1344–1364.
29. Samatanga B., Klostermeier D., DEAD-box RNA helicase domains exhibit a continuum between complete functional independence and high thermodynamic coupling in nucleotide and RNA duplex recognition. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(16): p. 10644–10654.
30. Umate P., Tuteja R., Tuteja N., Architectures of the unique domains associated with the DEAD-box helicase motif. *Cell Cycle*, 2010. 9(20): p. 4228-4235.
31. Grohman J.K., Del Campo M., Bhaskaran H., Tijerina P., Lambowitz A.M., Russell R., Probing the Mechanisms of DEAD-box Proteins as General RNA Chaperones: The C-terminal Domain of CYT-19 Mediates General Recognition of RNA. *Biochemistry*, 2007. 46(11): p. 3013–3022.
32. Huber M.D., Duquette M.L., Shiels J.C., Maizels N., A Conserved G4 DNA Binding Domain in RecQ Family Helicases. *Journal of Molecular Biology*. 358(4): p. 1071-1080.
33. Sidorova J.M., Li N., Folch A., Monnat R.J. Jr, The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest. *Cell Cycle*, 2008. 7(6): p. 796–807.
34. Mallam A.L., Sidote D.J., Lambowitz A.M., Molecular insights into RNA and DNA helicase evolution from the determinants of specificity for a DEAD-box RNA helicase. *eLife* 2014. 3(e04630).

*Ngày nhận bài: 17/10/2019*

*Ngày chấp nhận đăng: 06/12/2019*