

文章编号: 1004-0374(2009)01-0072-04

Z-DNA 及其生物学功能

汤雅男, 杨攀, 胡成钰*

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: Z-DNA 是一种处于高能状态、不稳定的 DNA 分子构象。形成 Z-DNA 的原因有很多: 首先, 转录过程中, 移动的 RNA 聚合酶在模板 DNA 的 5' 端产生负超螺旋扭曲力, 导致 Z-DNA 的形成; 其次, 含有 d(GC)_n 序列的核酸分子在高浓度的 NaCl、[Co(NH₃)₆]²⁺ 盐溶液中也能够形成 Z-DNA; 最后, 化学修饰也可以使 DNA 产生稳定的 Z-DNA。Z-DNA 是在体外首先发现的, 但随着研究的不断深入, 发现 Z-DNA 在体内也广泛存在并可能具有功能的多样性, 包括参与基因表达调控、染色体断裂、基因重组、抗病毒、病毒发生等生物学过程。

关键词: Z-DNA; 基因表达; Z-DNA 结合蛋白; 干扰素系统

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A

Z-DNA and its biological function

TANG Ya-nan, YANG Pan, HU Cheng-yu *

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Z-DNA is an instable and high energy DNA conformation *in vivo* and it can be formed in many conditions. Firstly, when RNA polymerase is moving on a DNA template, transcription can result in negative supercoiling behind the polymerase, thus facilitating Z-DNA conformation at permissive regions. Secondly, the Z-DNA-conformation which is formed by d(GC)_n sequence can also be stabled in high-salt solution of NaCl or [Co(NH₃)₆]²⁺ and lastly, the Z-DNA can be formed by covalent modifications. Though Z-DNA was firstly discovered *in vitro*, recently many evidences revealed that Z-DNA was widely existed and may possessed diversity of function *in vivo*, including gene expression and regulation, chromosomal breaks, recombination, antiviral defense and virus generation and so on.

Key words: Z-DNA; gene expression; Z-DNA binding protein; IFN system

在体内, DNA 分子以多种构象同时存在并处于动态变化之中, 包括右手螺旋 DNA (B-DNA)、左手螺旋 DNA (Z-DNA) 和处于 B- 和 Z-DNA 之间的 A-DNA。Z-DNA 最早发现于 20 世纪 70 年代。Pohl 和 Jovin^[1] 发现 d(GC)_n 在高盐溶液中的 CD 光谱与 B-DNA 不一样, 随后, Wang 等^[2] 也发现 d(GC)₃ 六聚体的构象与标准的 B-DNA 完全不同, 这些 d(GC)_n 分子磷酸和糖的骨架呈现 Z(zigzag) 字形走向, 故命名为 Z-DNA。尽管 Z-DNA 首先在体外发现, 但现有的资料充分表明 Z-DNA 在体内也广泛存在^[3], 并可能具有非常重要的生物学功能^[4], 即与基因的表达调

控有关, 可能参与染色体断裂、易位和基因重组, 以及参与抗病毒、病毒发生的病理过程等。

1 Z-DNA 的形成、分布及其特征

基因转录时, RNA 聚合酶在 DNA 双链上移动产生的负超螺旋能够使其局部的 DNA 产生 Z 型构象^[5], 所造成 DNA 链的局部不稳定性就成为潜在的解链位点。由于解螺旋是 DNA 复制和转录过程中的必需环

收稿日期: 2008-07-15; 修回日期: 2008-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(30560116)

*通讯作者: hucy2008@21cn.com

节, 所以, 这一区域可能与基因调控有关, 如人的 137 个基因中形成 Z-DNA 的序列都偏好分布在转录位点附近^[6]。由此, Brown 等^[7]认为 Z-DNA 偏好分布于基因的启动子附近。

由于负超螺旋插入片段能够提供 B-DNA 翻转为 Z-DNA 必需的能量, 因此, 在体外, Z-DNA 的形成不再依赖于某些特殊的序列, 而只要达到充分的负超螺旋能量即可。尽管如此, 在体内, 形成 Z-DNA 的核苷酸还是有强烈的偏好性^[5]。首先, 交替排列的嘌呤-嘧啶在负超螺旋条件下能形成 Z-DNA; 而与 d(AT) 序列相比, 交替的 d(GC) 序列最容易形成 Z-DNA^[8]。其次, DNA 的甲基化会使表面暴露的胞嘧啶形成 5-甲基胞嘧啶, 导致 B-DNA 向 Z-DNA 的转化^[9]。这种 C5 甲基化的现象在真核生物中非常常见。最后, 在高盐状态下, 一价或二价阳离子能有效屏蔽 Z-DNA 所需的高能, 从而使 Z-DNA 能在高盐状态下稳定存在。因此, Z-DNA 的形成可能有多因素诱导。

与 B-DNA 不同, Z-DNA 是一种处于高能状态的 DNA。所以, 在一定程度下, 它是不稳定的, 并随时会向 B-DNA 转变。在体内, Z-DNA 由转录或者展开核小体产生的负超螺旋来稳定, 常需要具有一些特定结构域的蛋白质(Z α 结合蛋白)帮助固定(图 1)。

Z-DNA 的高度不稳定性使得对它的研究变得十分困难。目前, 单晶体 X 射线衍射法(single-crystal X-ray)^[2]、扫描隧道显微镜(STM)^[10]、圆二色谱(circular dichroism, CD)^[1]和琼脂糖凝胶双向电泳可在体外鉴定 Z-DNA^[11]。例如 X 射线衍射法、扫描隧道显微技术可以直接分辨出 Z-DNA 分子的左手螺旋结构等。

2 Z-DNA 的功能

鉴于 Z-DNA 具有不稳定的物理性质, 很难获得

天然并具有活性 Z-DNA。目前在体外替代 Z-DNA 的均为人工合成的 d(GC)_n 及其重组质粒。这些人工合成的核酸分子须由高盐溶液或 Z-DNA 结合蛋白来稳定, 它们能否真实地反映体内 Z-DNA 的功能还不清楚。另外, 许多对 Z-DNA 的研究结果均来自 Z-DNA 与 Z-DNA 结合蛋白的 Z α 域结合复合物的报道, 因此, Z-DNA 的功能可能在很大的程度上与 Z α 有关。

2.1 Z-DNA 与基因表达 许多研究发现 Z-DNA 的形成与转录激活有着很强的直接关系。用哺乳动物 U937 细胞制备通透性细胞核证实, 当转录持续活化时, 带生物素标记的抗 Z-DNA 抗体进入细胞核的水平与核内基因转录水平成正相关^[12]。而且, 在 *c-MYC* 基因启动子附近的 3 个 DNA 片段仅在该基因处于活性转录时才能与抗 Z-DNA 抗体结合^[13]。进一步的研究证实, 启动子的活化与 Z-DNA 的形成可能是由 DNA 超螺旋所调控, 如在高渗生长培养基中增加 DNA 超螺旋比例使得鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 的入侵基因 *invA* 转录水平提高到低渗培养条件下的 8 倍左右, 反之通过促旋酶(gyrase)抑制剂降低 DNA 超螺旋水平同样也降低了 *invA* 表达的水平^[14]。

奇怪的是, Z-DNA 有时也抑制转录, 如超螺旋的松弛反而会促进鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸操纵子的表达^[15]。这种转录抑制可能是由于在转录过程中转录机器被 Z-DNA 阻滞的缘故。例如在体外, 大肠杆菌 RNA 聚合酶被阻挡在 Z-DNA 构象(CG)₁₆ 负超螺旋序列的边界, 当 Z-DNA 序列松弛并以 B 型存在时, 转录机器才能通过^[16]。进一步的研究发现, 如果一段序列包含 Z-DNA 元件, 那么这段序列很可能不能召集相关的转录因子。例如, 当一个转录因子 E2F 结合位点 GCGCGAAA 有一些 GC 或 GT 重复序列在临界的上游区并可能以 Z-DNA 构象存在时, 会阻碍 E2F 与转录因子的结合^[17]。若删除大鼠 Nc1

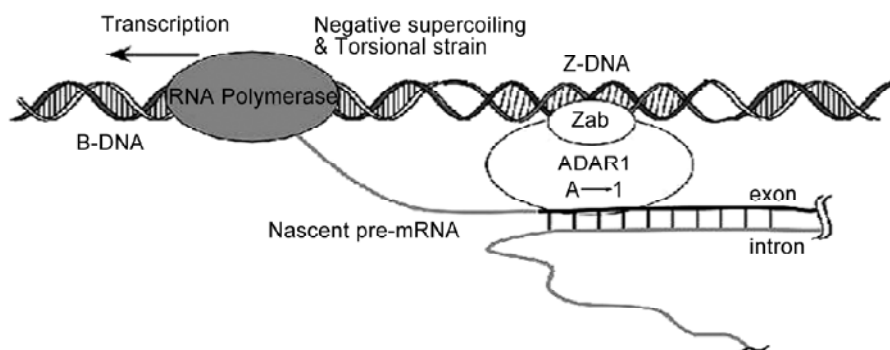


图1 Z-DNA 的形成与维持^[5]

启动子区和第 1 个内含子中含有的 (CA)₁₀(CG)₈ 序列, 反而可以使启动子活性增加 ~50%^[18]。同样, 在新杆状线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中, 当交替排列的嘌呤-嘧啶处在基因或启动子的两侧区时, 会表现出对 tRNA_{pro} 基因的表达有强烈的抑制效应^[19]。另外, Z-DNA 结合蛋白可能会以比转录因子更高的亲和力结合到这个靶 DNA 序列, 从而干扰了转录因子的结合和功能。

因此, Z-DNA 可能通过不同的方式调控基因表达, 调控方式也许与 Z-DNA 在基因中的位置和稳定性有关。当然, 具体的调控机制还有待进一步的研究。

2.2 Z-DNA 与诱导的遗传不稳定性 人致癌基因 *C-MYC* 中 Z-DNA 的形成会诱发遗传不稳定性^[13], 同样, Wang 等^[20] 也发现 (CG)₁₄ 形成的 Z-DNA 在细菌和哺乳动物细胞中会诱导高度的遗传不稳定。毫无疑问, 这种遗传不稳定性与 Z-DNA 诱发的染色体断裂热点 (chromosome breakage hot spots) 之间存在偶联关系^[21], 而且 Z-DNA 是染色体断裂热点中出现最频繁的元件。这暗示 Z-DNA 所造成的遗传不稳定是因为它参与了染色体断裂和易位。而且, 在白血病发现的染色体易位中, 拓扑异构酶 II 的剪切位点和 DNA 酶 I 敏感位点均位于染色体断裂热点区域。其中, DNase I 剪切 DNA 形成 B-Z 连接 (B-Z junctions) 处的单链区, 拓扑异构酶 II 偏好于结合和剪切 Z-DNA 形成序列区^[22]。目前看来, Z-DNA 诱发 DNA 链的断裂可能是遗传性疾病、突变产生的原动力之一。

(CG)₁₄ 诱发周围的 DNA 双链断裂导致整个重复序列和侧翼的突变报告基因大面积删除, 且断裂区域超过 400bp, 与白血病和淋巴瘤中的染色体断裂点的结果相一致^[20]。这种大范围删除在哺乳动物细胞中是非常显著的 (~95% 的突变), 但是在细菌中就非常少 (<5% 的突变)。除核基因组外, 携带 Z-DNA 形成序列的质粒在大肠杆菌中也很难留存, 这很有可能是因为含有 (CG) 的质粒在细菌中复制时, 质粒很容易被剔除的缘故, 也就是说携带 Z-DNA 的质粒在大肠杆菌中也很难留存。然而, 在大肠杆菌缺陷菌株 SURE® (缺陷了核酸酶的 *SbcC*、重组蛋白的 *RecB* 和 *RecJ* 以及修复蛋白的 *UmuC* 和 *UvrC*) 中, 具有 Z-DNA 形成序列的质粒非常稳定, 这表明在大肠杆菌中重组及修复活性可能与 Z-DNA 有关^[23]。另一方面, Z-DNA 诱导的遗传不稳定性可能会促进基因重组, 如酵母中的 GT 序列 (34bp) 能够促进减数分裂重组^[24]。Kobori 等^[25] 认为小鼠染色体中 2% 的重组

可能与其存在许多长链 GT 重复拷贝有关。加入抗 Z-DNA 抗体或者改变 DNA 超螺旋密度会破坏 Z-DNA 构象和抑制重组中链的配对^[22]。另外, 由 Z-DNA 诱导的 DNA 双链断裂 (DSB) 也很可能导致重组, 如非等位姐妹染色单体会发生交换^[26]。

尽管如此, Z-DNA 诱导遗传不稳定性的机制还不十分清楚, 推测可能与复制滑动 (slippage) 有关。而 (GC)₄(GT)₂(GC)₃GT(GC)₄ 和 (CG)₅(TA)₃(CG)₄ 的 GT 和 AT 插入到 GC 重复序列中打断了 GC 的连续性, 降低了滑动事件, 因此, 非 Z-DNA 核酸分子表现出比 (CG)₁₄ 在大肠杆菌中明显减少的被剔除频率^[20]。

2.3 Z-DNA 与干扰素系统 在许多情况下, Z-DNA 是与其结合蛋白共同在体内行使重要作用的, 特别是在病毒发生和宿主先天免疫防御过程中。所以, Z-DNA 结合蛋白在体现和维持 Z-DNA 功能中有重要的作用。近年来, 在人类、哺乳类、痘类病毒和鱼类中报道了多种 Z-DNA 结合蛋白^[27]。其中 ADAR1 (adenosine deaminases acting on RNA)、ZBP1 (Z-DNA binding protein 1, DLM-1)、PKZ (protein kinase containing Z-DNA binding domain, PKR-like) 为干扰素诱导蛋白, 它们在细胞抗病毒过程中起作用, 而 E3L 为病毒分泌蛋白, 能够抵御宿主干扰素系统的抗病毒作用。因此, Z-DNA 与干扰素系统密切相关。

E3L 是牛痘病毒分泌的致病蛋白, 与 Z-DNA 结合后可能会干扰宿主防御系统运行^[28]。Z-DNA 能与 ADAR1 特异结合并被稳定, 使 ADAR1 能够行使抗病毒的功能^[6]。DLM-1 (ZBP1) 在自身免疫反应中扮演一个传感器的作用, 通过 Z-DNA 与其调节区域结合激活, 而后功能区招募 IRF3 和 TBK1 因子并传递诱导启动 I 型干扰素的表达^[29]。斑马鱼 PKZ 与 Z-DNA 有明显的结合^[30], 同样, 鲫鱼 PKZ 的 Z α 能与包含 d(GC)₁₃ 的重组质粒结合^[31]。有趣的是, 鱼类 PKZ 与哺乳动物 PKR (dsRNA-activated protein kinase) 具有相类似的功能, 即由病毒感染而激活并随后磷酸化翻译起始因子 eIF2 α , 导致细胞中蛋白合成的整个下游调控减弱并抑制病毒复制^[32], 但 PKZ 是由 Z-DNA 激活而不同于 PKR 的 dsRNA 激活。Z-DNA 究竟如何与鱼类 PKZ 结合及其有何生物学意义还有待进一步的研究。

3 展望

Z-DNA 与许多生物学和病理过程有关的证据使人们对 DNA 的物理结构与疾病发生的关系有了新的认识。虽然对 Z-DNA 在体内确切的功能和机制还不

完全了解(部分原因是Z-DNA的不稳定性而使实验受阻), 但已有的证据足以支持Z-DNA与这些过程有关系。所以, 未来的研究应该细化Z-DNA在发育和组织特异性等方面相关作用机制的探讨, 鉴定与Z-DNA相互作用的一整套反式作用因子及其与疾病之间的关系等。

[参 考 文 献]

- [1] Pohl FM, Jovin TM. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG-dC). *J Mol Biol*, 1972, 67(3): 375-96
- [2] Wang AJ, Quigley GJ, Kolpak FJ, et al. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*, 1979, 282(5740): 680-6
- [3] Liu R, Liu H, Chen X, et al. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, 2001, 106(3): 309-18
- [4] Wong B, Chen S, Rich A, et al. Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7): 2229-34
- [5] Brown BA, Rich A. The left-handed double helical nucleic acids. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48(2): 295-312
- [6] Schroth GP, Chou PJ, Ho PS. Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *J Biol Chem*, 1992, 267(17): 11846-55
- [7] Brown II BA, Lowenhaupt K, Wilbert CM, et al. The Z α domain of the editing enzyme dsRNA adenosine deaminase binds left-handed Z-RNA as well as Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13532-6
- [8] Ho PS, Ellison MJ, Quigley GJ, et al. A computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences. *EMBO J*, 1986, 5(10): 2737-44
- [9] Rich A, Zhang S. Z-DNA: the long road to biological function. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(7): 566-72
- [10] Arscott PG, Lee G, Bloomfield VA, et al. Scanning tunnelling microscopy of Z-DNA. *Nature*, 1989, 339(6224): 484-6
- [11] Lushnikov AY, Brown BA, Oussatcheva EA, et al. Interaction of the Z α domain of human ADAR1 with a negatively supercoiled plasmid visualized by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(15): 4704-12
- [12] Wittig B, Dorbic T, Rich A. Transcription is associated with Z-DNA formation in metabolically active permeabilized mammalian cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2259-63
- [13] Wölfel S, Wittig B, Rich A. Identification of transcriptionally induced Z-DNA segments in the human c-myc gene. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1264(3): 294-302
- [14] Galán JE, Curtiss R III. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun*, 1990, 58(6): 1879-85
- [15] O'Byrne CP, NíBhriain N, Dorman CJ. The DNA supercoiling-sensitive expression of the *Salmonella typhimurium* his operon requires the his attenuator and is modulated by anaerobiosis and by osmolarity. *Mol Microbiol*, 1992, 6(17): 2467-76
- [16] Peck LJ, Wang JC. Transcriptional block caused by a negative supercoiling induced structural change in an alternating CG sequence. *Cell*, 1985, 40(1): 129-37
- [17] Vasudevaraju P, Bharathia, Garruto RM, et al. Role of DNA dynamics in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, 2008, 58(1): 136-48
- [18] Rothenburg S, Nolte FK, Rich A, et al. A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8985-90
- [19] Santoro C, Costanzo F, Ciliberto G. Inhibition of eukaryotic tRNA transcription by potential Z-DNA sequences. *EMBO J*, 1984, 3: 1553-9
- [20] Wang GL, Christensen LA, Vasquez KM. Z-DNA-forming sequences generate large-scale deletions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2677-82
- [21] Aplan PD, Raimondi SC, Kirsch IR. Disruption of the SCL gene by a t(1-3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, 1992, 176(5): 1303-10
- [22] Sabourin M, Nitiss JL, Nitiss KC, et al. Yeast recombination pathways triggered by topoisomerase II-mediated DNA breaks. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): 4373-84
- [23] Klysik J, Stirdivant SM, Wells RD. Left-handed DNA cloning, characterization, and instability of inserts containing different lengths of (dC-dG) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1982, 257: 10152-8
- [24] Treco D, Arnheim N. The evolutionarily conserved repetitive sequence d(TG. AC)n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(11): 3934-47
- [25] Kobori JA, Strauss E, Minard K, et al. Molecular analysis of the hotspot of recombination in the murine major histocompatibility complex. *Science*, 1986, 234: 173-9
- [26] Weinreb A, Collier DA, Birshtein BK, et al. Left-handed Z-DNA and intramolecular triplex formation at the site of an unequal sister chromatid exchange. *J Biol Chem*, 1990, 265(3): 1352-9
- [27] 时俊华, 陶敏, 许丹, 等. Z-DNA结合蛋白与Z α 结构域. *生命的化学*, 2008, 28(2): 165-8
- [28] Kim YG, Muralinath M, Brandt T, et al. A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 6974-9
- [29] Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 2007, 448(7152): 501-5
- [30] Rothenburg S, Deigendesch N, Dittmar K, et al. A PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase from zebrafish contains Z-DNA binding domains instead of dsRNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5): 1602-7
- [31] 陶敏, 吴初新, 杨攀, 等. 鲫鱼PKR-like Z α 与d(GC)13质粒的结合及其适应性进化. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(4): 494-8
- [32] Bergan V, Jagus R, Lauksund S, et al. The Atlantic salmon Z-DNA binding protein kinase phosphorylates translation initiation factor 2 α and constitutes a unique orthologue to the mammalian dsRNA-activated protein kinase R. *FEBS J*, 2008, 275(1): 184-97