

# 酿酒酵母中脱氧羟腐胺赖氨酸合酶的结构研究

李珍珍,孟肖肖,乔治,戴莉,杨晓娜,滕衍斌

**摘要** 目的 通过研究酿酒酵母中脱氧羟腐胺赖氨酸合酶 DHS(Dys1)的结构,揭示羟腐胺赖氨酸化修饰的分子机制,为人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)等高增殖性疾病的治疗提供理论基础和依据。方法 利用大肠埃希菌BL21表达系统,体外构建表达载体并表达Dys1。通过亲和层析、分子筛等方法分离纯化Dys1的蛋白质样品。在6%聚乙二醇(PEG)8000、0.1 mol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes) pH 6.5、8% 乙二醇的条件下得到Dys1的锥形晶体。用X射线衍射晶体,用CCP4i、Coot软件解析2.8 Å分辨率下的Dys1三维晶体结构。结果 Dys1的整体结构为四聚体,活性口袋和辅因子NAD<sup>+</sup>结合位点位于每个单体之间,单体的核心部位形成一个罗斯曼折叠,构成活性位点的氨基酸残基具有高度保守性。结论 首次解析了Dys1的三维结构,发现了辅因子NAD<sup>+</sup>与酶的结合模式,证实了该酶四聚体的形式和N端的模体是其行使催化功能所必需的。

**关键词** 酿酒酵母;脱氧羟腐胺赖氨酸合酶;蛋白质表达纯化;晶体结构;X-射线晶体衍射

**中图分类号** Q 518.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)12-1995-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.002

脱氧羟腐胺赖氨酸合酶(deoxyhypusine synthase, DHS)(编号:EC 1.1.1.249)普遍存在于真核生物中,参与真核翻译起始因子-5A(eukaryotic initiation factor -5A, eIF-5A)的翻译后修饰,在细胞增殖、死亡、肿瘤生长、炎症反应和免疫应答等方面发挥着重要作用<sup>[1]</sup>,其缺失可导致糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森病等多种人类常见疾病<sup>[2]</sup>。DHS参与eIF-5A翻译后修饰的首步反应,该催化依赖辅因子NAD<sup>+</sup>。DHS能够催化脱氢亚精胺的丁胺基部分将其转移至底物蛋白eIF-5A N端loop区保守的赖氨酸ε位氨基上,从而生成脱氧羟腐胺赖氨酸<sup>[3]</sup>。酿酒酵母作为一种重要的真核模式生物,是研究真核

生物酶进化和蛋白质相互作用的经典模型,有利于研究羟腐胺赖氨酸化修饰过程<sup>[4-6]</sup>。然而DHS调控机制仍然不完全清楚,并且由于结构解析的困难,难以得到蛋白质的高分辨率结构,这限制了对DHS功能的深入理解。现以酿酒酵母中DHS(deoxyhypusine synthase, Dys1)为研究对象,通过解析其晶体结构来探究羟腐胺赖氨酸化修饰的分子机制和催化过程,为多种疾病的治疗和相关药物开发提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 大肠埃希菌BL21、大肠埃希菌Top10菌株, pET-28a质粒(北京诺禾致源科技股份有限公司合成);S288C酿酒酵母基因组模板(中国科技大学生命科学学院提供)。

**1.1.2 主要试剂** 重组质粒构建:高保真Taq酶(上海吐露港生物科技有限公司,货号:21804-02);T4 DNA连接酶,限制性内切酶NdeI、NotI(美国ThermoFisher公司,货号:EL0011、ER0585、ER0595);胶回收试剂盒(美国Omega公司,货号:D2500-02);异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl-β-D-1-thiogalactoside, IPTG)(上海捷瑞生物工程有限公司,货号:R11758);缓冲液试剂:三羟甲基氨基甲烷(上海生工生物工程有限公司,货号:T0826)、氯化钠(上海国药集团化学试剂有限公司,货号:10019318);晶体优化试剂:聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)8000、乙二醇、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonic acid, Hepes)(上海阿拉丁有限公司,货号:P274350、E117900、H109407);晶体初筛试剂盒:Crystal Screen I、Crystal Screen II(美国Hampton公司,货号:HR2-110、HR2-112)。

**1.1.3 主要仪器** 蛋白纯化仪系统(型号:ÄKTA Pure 25M,美国GE公司);Superdex™200层析柱(型号:HiLoad™16/600,美国GE公司);镍离子金属螯合(Ni<sup>2+</sup>-NTA)亲和层析柱(型号:L00250-100,南京金斯瑞生物科技有限公司)紫外分光光度仪(型号:UV-1200,上海美谱达仪器有限公司);PCR仪(型

2023-10-23 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2022AH050684)

作者单位:安徽医科大学生命科学院,合肥 230032

作者简介:李珍珍,女,硕士研究生;

滕衍斌,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: tengyanbin@ahmu.edu.cn

号:GE9612T-S,杭州柏恒科技有限公司);高速冷冻离心机(型号:J-26S XPI,美国 Beckman 公司);超声波细胞粉碎机(型号:JY92-IIN,宁波新芝生物科技股份有限公司);体视显微镜(型号:EZ4W,德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DYS1 重组质粒的构建 以酿酒酵母的基因组 DNA 为模板进行 DYS1 基因的 PCR 扩增。PCR 反应程序如下:30 个循环(94 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 40 s,72 °C 10 min)。将扩增的 DYS1 基因产物经过限制性内切酶酶切、连接酶连接插入至载体 pET-28a,将构建好的重组质粒进行双酶切(NdeI、NotI)2.5 h 后,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳验证。送至合肥有康生物有限公司测序确认其序列正确。

1.2.2 Dys1 目的蛋白的诱导表达及裂解液的制备 将重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中,培养重组菌株至在 600 nm 波长处的吸光度值为 0.6,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的诱导剂 IPTG,在 160 r/min、16 °C 条件下继续培养 20 h。离心收集表达完成的大肠埃希菌(6 000 r/min;6 min),使用 20 ml 缓冲液(20 mol/L Tris pH 8.0、200 mmol/L NaCl)重悬。超声破碎(功率 30%,开 1 s 关 5 s)15 min 后离心(16 000 r/min、30 min),取上清液用于后续纯化。

1.2.3 亲和层析法、分子筛层析法纯化 Dys1 蛋白 将上清液上样至 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析柱。上样前使用 10 倍柱体积含 20 mmol/L Tris pH 8.0、200 mmol/L NaCl 的缓冲液平衡层析柱,使用 5 ml 含 250 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris pH 8.0、200

mmol/L NaCl 的洗脱液洗脱目标蛋白。将洗脱液上样至 Superdex™200 层析柱进行分子筛纯化。根据 280 nm 吸收峰收集目标蛋白质。

1.2.4 晶体生长 将纯化后的蛋白质浓缩至 10 mg/ml,使用试剂盒 Crystal Screen I、Crystal Screen II 初筛蛋白质晶体。生长条件为:下槽中 100 μl 初筛试剂,上槽中混合 1 μl 蛋白质和 1 μl 下槽液。出现晶体后进行晶体优化。

1.2.5 X-射线衍射法收集晶体的衍射数据 捞取单个晶体,加入防冻液(晶体生长的条件中加 20% 的甘油)保存到液氮中,于上海同步辐射光源(SSRF)BL18U1 蛋白质微晶体结构衍射工作线站进行 X-射线衍射。在 -173 °C、0.978 Å 的波长条件下收集了一套分辨率为 2.8 Å 的衍射数据。收集的衍射数据使用 HKL2000 软件进行处理。

1.2.6 分子置换法解析晶体结构 以人源(H. sapiens)DHS 结构(PDB ID:1DHS)为模型,利用分子置换法解析结构。使用 CCP4i<sup>[7]</sup>中程序 MOLREP<sup>[8]</sup>找到初始相位。初始模型通过 CCP4i 中的 REFMAC5<sup>[9]</sup>进行 10 轮修正,再使用 COOT<sup>[10]</sup>进行人工修正。修正好的模型使用 PROCHECK<sup>[11]</sup>和 MOLPROBITY<sup>[12]</sup>程序进行检查。结构图均使用 PyMol 软件(http://pymol.sourceforge.net/)生成。

2 结果

2.1 DYS1 重组质粒 PCR 测序结果 重组质粒酶切后的质粒呈现两条 DNA 带,下端的 DNA 带分子量与 DYS1 全长序列的分子量一致(图 1A)。构建的重组质粒测定的序列与 DYS1 的全长基因序列相同(图 1B)。

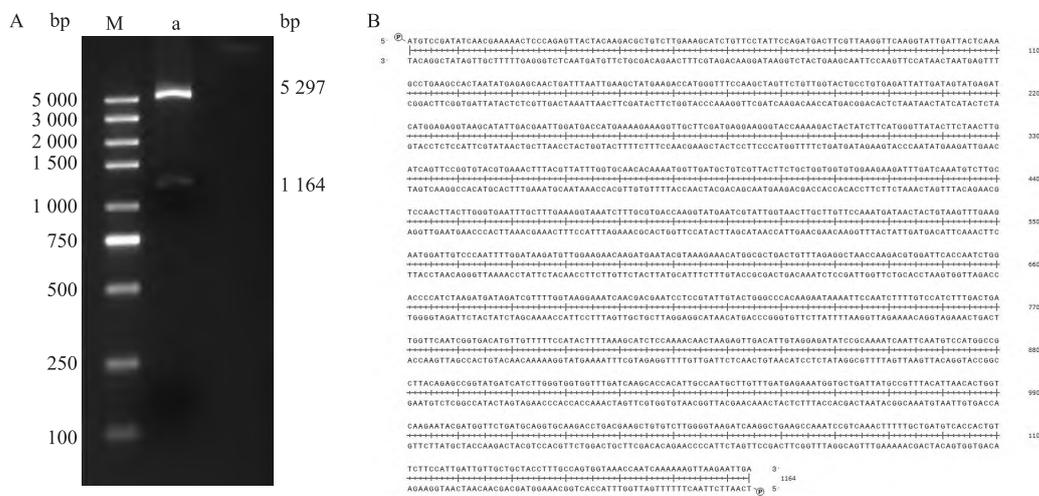


图 1 DYS1-pET-28a 重组质粒电泳图及测序结果图

A: DYS1-pET-28a 重组质粒双酶切电泳结果;B: DYS1-pET-28a 重组质粒中全长 DYS1 序列测序结果拼接;M:Marker;a:细胞克隆的质粒 DNA

**2.2 Dys1 蛋白质的纯化与结晶** Dys1 分子量约为 43 ku,通过分子筛实验发现 Dys1 出峰位置对应的分子量约为 130 ku,推测 Dys1 在溶液中以四聚体的形式存在。SDS-PAGE 分析结果显示,在分子筛纯化后可见一条显著目的条带,Dys1 蛋白质的纯度达到 95% 以上(图 2A)。将纯化后的 Dys1 蛋白质浓缩至 10 mg/ml,进行晶体的初步筛选。蛋白晶体通过 Crystal Screen 试剂盒的初步筛选和优化实验,最终在 6% PEG 8000,8% 乙二醇、0.1 mol/L Hepes pH 6.5 的条件下获得表面光滑、形状规则的菱形蛋白质晶体。观察发现,蛋白质晶体生长一周后达到最大体积(图 2B)。

**2.3 Dys1 整体结构** 本研究通过分子置换的方法解析了 Dys1 的晶体结构,其分辨率为 2.8 Å。最终的数据收集和结构修正参数见表 1。晶体结构中,Dys1 包含两对紧密结合的二聚体(A1B1 和 A2B2),两个亚基 A1 与 B1、A2 与 B2 形成的相互作用面积为 2 830 Å<sup>2</sup>,A1 与 A2、B1 与 B2 形成相互作用面积为 2 470 Å<sup>2</sup>。在 A1 与 B1、A2 与 B2 的界面上分布有两个对称的活性位点(图 3A)。Dys1 的单体结构包含 13 条 α-螺旋和 9 条 β-折叠股。α6 到 α7 之间、α9 到 α10 之间分别形成一段长 loop 区。β3、α5、β4 共同形成 βαβ 模体。6 条平行的 β-折叠股

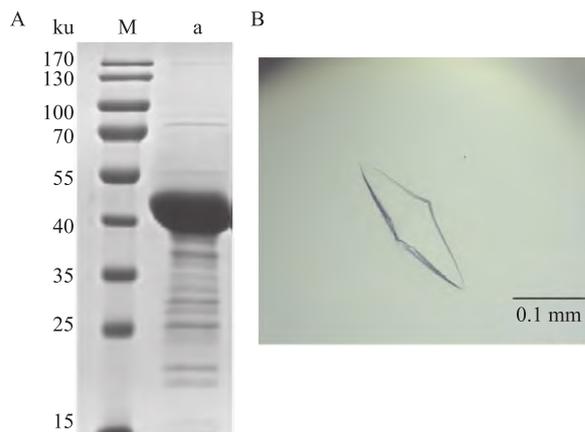


图 2 Dys1 蛋白质纯化的 SDS-PAGE 结果与单一晶体图

A: Dys1 的 SDS-PAGE 结果图; B: Dys1 的单一晶体图; M: Marker; a: Dys1 分子筛纯化洗脱液

(β1~2, β6~9) 和 4 条 α-螺旋(α2、α4、α13、α11) 形成罗斯曼折叠,该折叠位于单体中心,结合 1 个 NAD<sup>+</sup> 分子(图 3B)。

**2.4 辅因子 NAD<sup>+</sup> 结合位点** Dys1 的催化依赖于辅因子 NAD<sup>+</sup>。反应由 NAD<sup>+</sup> 的烟酰胺上的 C4 原子发起,使亚精胺的 C5 原子上的氢离子转移至 NAD<sup>+</sup> 的烟酰胺处,从而使底物亚精胺脱氢生成脱氢亚精胺。在结构中,NAD<sup>+</sup> 结合于一条深约 17 Å 的口袋内(图 4A)。NAD<sup>+</sup> 主要通过氢键相互作用

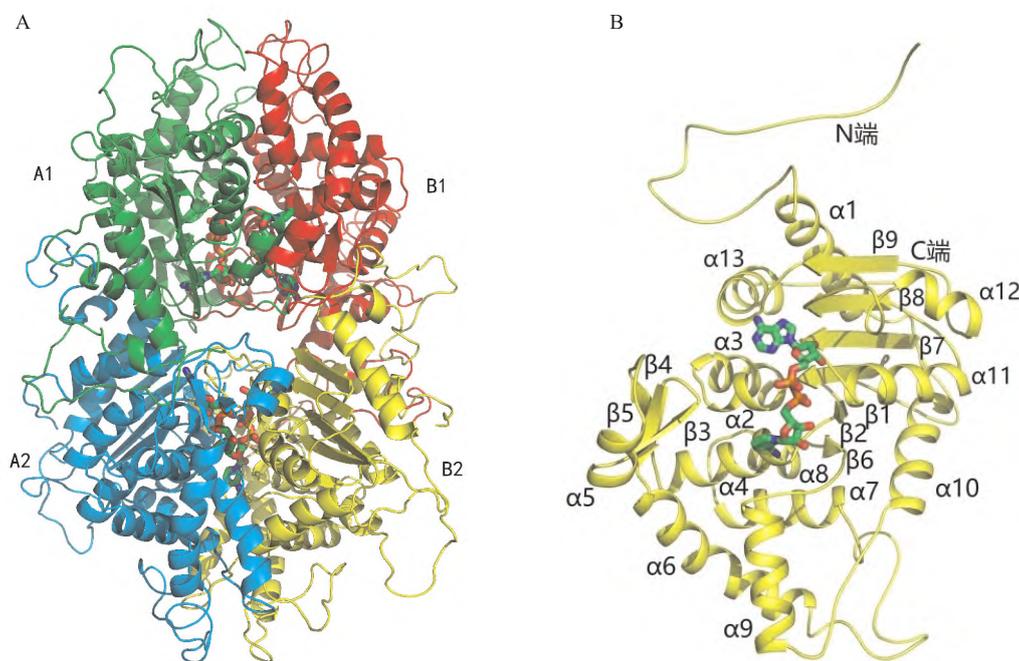


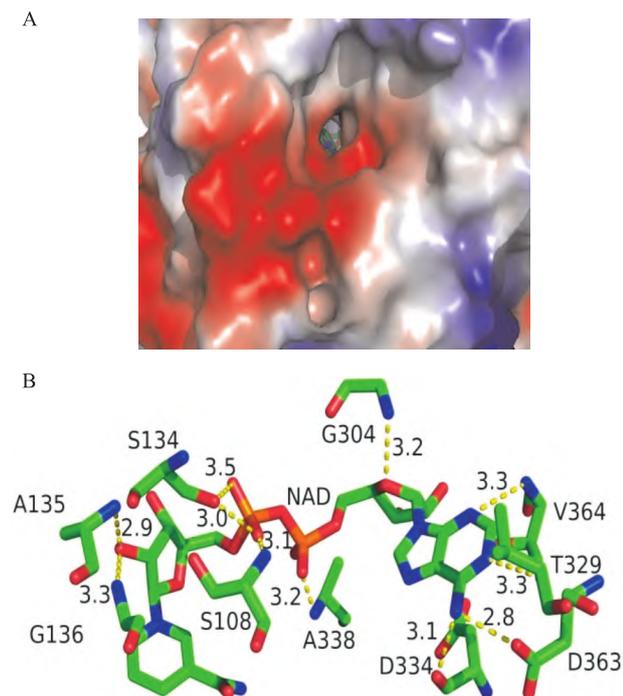
图 3 Dys1 蛋白的整体三维结构图及单体结构图

A: Dys1 的四聚体结构图;四聚体中的亚基 A1 标记为绿色,A2 标记为天蓝色,B1 标记为红色,B2 标记为黄色;NAD<sup>+</sup> 由棍状结构表示;B: Dys1 的单体结构图;Dys1 的单体标记为黄色;NAD<sup>+</sup> 由棍状结构表示,其中碳原子标记为绿色,氮原子标记为蓝色,氧原子标记为红色,磷原子标记为橙色

表1 Dys1 蛋白晶体结构的参数

收集与修正参数	Dys1
空间群	P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2
晶胞参数(Å)	a = b = 117.00, c = 139.79, α = β = γ = 90.00
分辨率范围(Å)	140.00 ~ 2.80(2.88 ~ 2.80) <sup>a</sup>
唯一衍射点	22 455 (1 594)
完整性(%)	99.5 (96.4)
<I/σ(I)>	22.1 (8.1)
Rmerge(%)	5.6 (23.9)
R-factor/R-free(%)	25.82/28.26
蛋白原子数(个)	5 275
键长(Å)	0.011
键角(Å)	1.248

稳定 Dys1 的结构。其中腺嘌呤环与残基 Thr 329、Asp 334、Asp 363、Val 364 形成氢键；磷酸基团与残基 Ser 108、Ser 134、Ala 338 形成氢键；呋喃糖环与残基 Ala 135、Gly 136、Gly 304 形成氢键(图 4B)。氢键相互作用有利于 NAD<sup>+</sup> 的结合,并稳定 Dys1 的构象以辅助催化反应。

图4 活性位点口袋表面电势图及 NAD<sup>+</sup> 与周围残基结合位点图

A: 活性位点口袋表面电势图;红色区域为负电区域,蓝色区域为正电区域,白色区域为非极性区;B: NAD<sup>+</sup> 与周围残基结合位点图;黄色虚线表示氢键作用,数字表示原子之间的距离;NAD<sup>+</sup> 和周围残基以棍状表示,其中碳原子标记为绿色,氮原子标记为蓝色,氧原子标记为红色,磷原子标记为橙色

**2.5 底物亚精胺结合位点** 底物亚精胺结合位点由 His 309、Asp 262、Ser 259、Ser 108、Glu 139、Asn 109、Tyr 179、Ile 169、Glu 344、Trp 348、Ala 340、Lys

350、Leu 316,13 个氨基酸残基构成(图 5A)。其中酸性氨基酸 Asp 262、Glu 139 分布于结合位点入口处,可以促进碱性底物亚精胺以及 eIF-5A N 端 loop 区保守赖氨酸的进入。底物结合位点呈“L”型,在空间上该位点紧靠辅因子 NAD<sup>+</sup>(图 5B),有利于发生亚精胺的脱氢反应,生成脱氢亚精胺。通过结构分析及此前催化机制推测 Dys1 与其他物种 DHS 机制类似,Lys 350 的 ε-氨基攻击脱氢亚精胺 C5 原子与 N4 原子之间的碳氮双键,使其断裂,脱氢亚精胺断裂后形成的丁胺基部分转移至底物蛋白 eIF-5A N 端 loop 区保守的赖氨酸 ε-氨基上,形成最终产物脱氧羟腐胺赖氨酸。

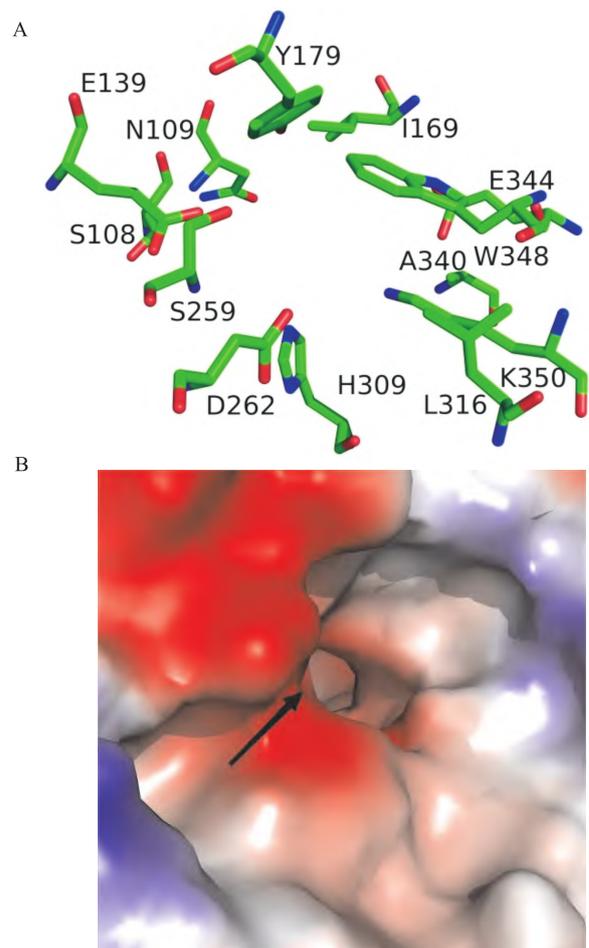


图5 亚精胺口袋残基结合位点图及口袋表面电势图

A: 亚精胺口袋残基结合位点图;残基以棍状表示,其中碳原子标记为绿色,氮原子标记为蓝色,氧原子标记为红色,磷原子标记为橙色;B: 亚精胺口袋表面电势图;红色区域为负电区域,蓝色区域为正电区域,白色区域为非极性区

**2.6 Dys1 的结构比对** 目前已有 4 种不同来源的 DHS 晶体结构,包括热带病锥虫病的致病布氏锥虫 (*Trypanosomatid. Brucei*, TbDHS) 极端嗜热球古菌

(*Pyrococcus horikoshii* OT3, *PhoDHS*) 以及人源的 DHS (Human) hDHS 等。其中 *TbDHS* 为异四聚体。通过三维结构比对发现, *Dys1* 的整体结构与 *PhoDHS* 和 hDHS 相似(图 6A), 值得注意的是 *Dys1* N 端缺少一段“球链基序”。*Dys1* 的晶体生长在适宜的离子强度和较中性的 pH 6.5 条件下, 该条件下 N 端“球链基序”以柔性方式展开, 使活性位点暴露, 方便底物进入进而完成催化。此外, *Dys1* 在  $\alpha 6$  和  $\alpha 13$  螺旋处与 *PhoDHS*、hDHS 的结构有明显差异。*Dys1* 的  $\alpha 6$  和  $\alpha 13$  处螺旋长度短, 在其后有一段 loop 环区。*Dys1* 中  $\text{NAD}^+$  分子的三维结构整体保守, 只在烟酰胺环处存在差异(图 6B)。 *Dys1* 中构成亚精胺活性口袋的氨基酸在结构上高度保守(图 7), 这与一级序列比对的结果一致。根据一级序列比对显示 Glu 195 到 Thr 221 之间和 Thr 375 后的氨基酸残基并不保守, 使  $\alpha 6$  和  $\alpha 13$  处螺旋后的 loop 环区具有一定的柔性。烟酰胺环相互作用方式存在的差异可能是因为它与周围残基无氢键相互作用。一级序列比对表明构成  $\text{NAD}^+$  活性口袋的氨基酸残基 (His 309、Trp 348、Lys 350、Ser 108、Gly 136、Gly 304、Asp 334、Ala 135、Thr 329、Asp 363) 高度保守, 其余残基 Ser 134、Ala 338、Val 364 不保守(图 8)。

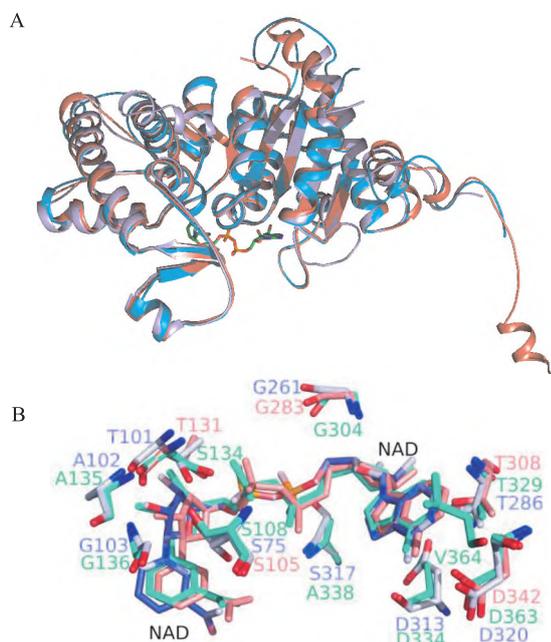


图 6 *Dys1*、hDHS 和 *PhoDHS* 的整体结构与  $\text{NAD}^+$  位点比对图

A: *Dys1*、hDHS 和 *PhoDHS* 的整体结构对比图; hDHS 标记为粉色, *PhoDHS* 标记为紫色, *Dys1* 标记为天蓝色,  $\text{NAD}^+$  分子标记为绿色; B: *Dys1*、hDHS 和 *PhoDHS* 的  $\text{NAD}^+$  位点比对图; *Dys1*、*PhoDHS*、hDHS 中的  $\text{NAD}^+$  分子显示为棍状, 分别标记为天蓝色、紫色与粉色; *Dys1*、*PhoDHS*、hDHS 中与  $\text{NAD}^+$  分子相互作用的氨基酸分别标记为天蓝色、紫色和粉色

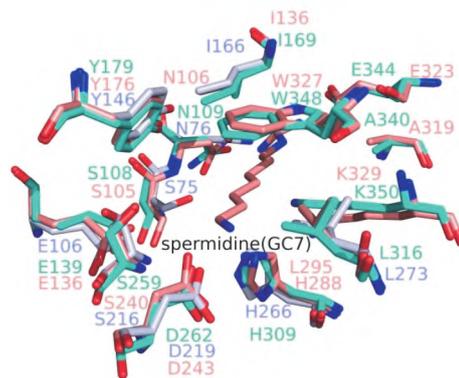


图 7 *Dys1*、hDHS 和 *PhoDHS* 的亚精胺底物口袋位点比对图

*Dys1*、*PhoDHS*、hDHS 中形成亚精胺底物口袋的氨基酸分别标记为天蓝色、紫色和粉色; hDHS 中的亚精胺分子标记为粉色

### 3 讨论

蛋白质的翻译后修饰在多种细胞过程中发挥着重要作用, 常作为一种调节机制调整环境变化时的细胞反应。其中羟腐胺赖氨酸化修饰对 eIF-5A 行使功能起到不可或缺的作用。DHS 是催化羟腐胺赖氨酸化修饰的关键酶, 研究<sup>[13]</sup>表明, 当 eIF-5A 修饰位点的赖氨酸突变后, 因无法进行羟腐胺赖氨酸化修饰, 导致 eIF-5A 突变株酵母死亡, 并且该修饰位点的突变也与多种人类颅面神经发育畸形等疾病相关<sup>[14]</sup>。

本研究解析了酿酒酵母中 *Dys1* 高分辨率结构, 分析了 *Dys1* 的辅因子  $\text{NAD}^+$  的作用位点, 并将 *Dys1* 与不同来源的 DHS 的整体结构、 $\text{NAD}^+$  结合位置以及底物亚精胺结合口袋进行对比, 发现 *Dys1* 的总体结构保守, 辅因子  $\text{NAD}^+$  与酶的结合主要通过氢键相互作用稳定  $\text{NAD}^+$  辅因子, 底物亚精胺结合口袋高度保守。结合文献报道<sup>[15]</sup>, *Dys1* 催化酿酒酵母 eIF-5A 的过程是短暂的, 对 eIF-5A N 端结构域赖氨酸进行第一步修饰, 完成后 eIF-5A 就会离开 *Dys1*, 并且在相互作用的过程中 *Dys1* 和 eIF-5A 的三维结构不会发生明显变化。

本研究为设计有效的 DHS 抑制剂奠定了结构基础, DHS 的抑制剂可用于控制如 HIV-1 病毒复制等高增殖性疾病。未来还将继续致力于 DHS 抑制剂的开发, 基于 *Dys1* 的结构, 通过虚拟筛选方法得到潜在的抑制剂小分子, 利用体外实验验证小分子抑制剂与 DHS 亲和力, 设计细胞实验和体内实验验证抑制效果, 最终优化得到理想抑制剂, 为后续相关药物开发奠定基石。

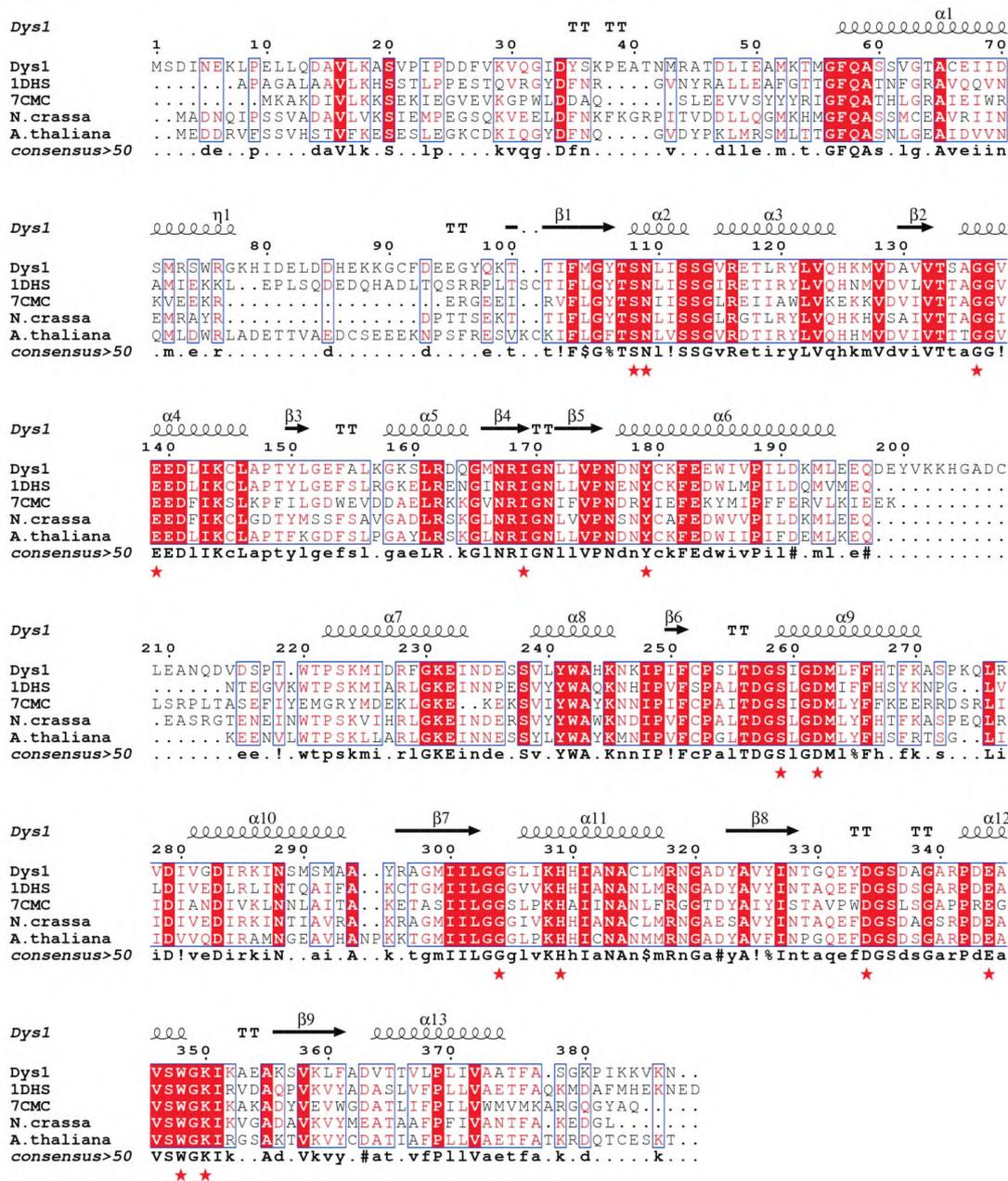


图8 Dys1 一级序列比较图

红色氨基酸为进化上保守氨基酸;序列上方的蓝色框表示至少有两种生物序列具有相似性;三种及以上生物的共同序列用红色填充标记;Dys1 蛋白的二级结构标记在顶部;活性位点的高度保守氨基酸在最下方用红色五角星标记

参考文献

[1] Anderson-Baucum E, Piñeros A R, Kulkarni A, et al. Deoxyhypusine synthase promotes a pro-inflammatory macrophage phenotype[J]. Cell Metab,2021,33(9):1883-93.

[2] Park M H, Kar R K, Banka S, et al. Post-translational formation of hypusine in eIF5A: implications in human neurodevelopment [J]. Amino Acids,2022,54(4):485-99.

[3] Wařtor E, Wilk P, Grudnik P. Half way to hypusine-structural basis for substrate recognition by human deoxyhypusine synthase[J]. Biomolecules,2020,10(4):522.

[4] Wloch-Salamon D M, Fisher R M, Regenberg B. Division of labour in the yeast; *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast,2017,34(10):399-406.

[5] Landry C R, Townsend J P, Hartl D L, et al. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Ecol, 2006,15(3):575-91.

[6] Nguyet V T A, Furutani N, Ando R, et al. Acquired resistance to severe ethanol stress-induced inhibition of proteasomal proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2022,1866(12):130241.

[7] Agirre J, Atanasova M, Bagdonas H, et al. The CCP4 suite: inte-

- grative software for macromolecular crystallography[J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*,2023,79(Pt 6):449–61.
- [8] Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,2010,66(Pt 1):22–5.
- [9] Murshudov G N, Vagin A A, Dodson E J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,1997,53(3):240–55.
- [10] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,2004,60(Pt 12 Pt 1):2126–32.
- [11] Morris A L, MacArthur M W, Hutchinson E G, et al. Stereochemical quality of protein structure coordinates[J]. *Proteins*, 1992,12(4):345–64.
- [12] Chen V B, Arendall W B 3rd, Headd J J, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,2010,66(Pt 1):12–21.
- [13] Cheng Y, Zhu H, Du Z, et al. Eukaryotic translation factor eIF5A contributes to acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* via transcriptional factor Ume6p[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14(1):38.
- [14] Faundes V, Jennings M D, Crilly S, et al. Impaired eIF5A function causes a Mendelian disorder that is partially rescued in model systems by spermidine[J]. *Nat Commun*,2021,12(1):833.
- [15] Wątor E, Wilk P, Biela A, et al. Cryo-EM structure of human eIF5A-DHS complex reveals the molecular basis of hypusination-associated neurodegenerative disorders[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):1698.

## The study on the structure of deoxyhypusine synthase in *Saccharomyces cerevisiae*

Li Zhenzhen, Meng Xiaoxiao, Qiao Zhi, Dai Li, Yang Xiaona, Teng Yanbin  
(College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the structure of deoxyhypusine synthase (DHS) in *Saccharomyces cerevisiae* (Dys1) and unravel the molecular mechanism of hypusine lysine modification, providing a theoretical basis for the treatment of highly proliferative diseases such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. **Methods** Using the *E. coli* BL21 expression system, an *in vitro* expression vector was constructed and used to express the protein of Dys1. Dys1 protein samples were purified using methods such as affinity chromatography and molecular sieving to achieve protein purification and isolation. The crystals of Dys1 were obtained using the crystallized solution containing 6% Polyethylene Glycol (PEG) 8000, 0.1 mol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonic acid (Hepes) pH 6.5, and 8% ethylene glycol. The crystal structure of Dys1 was resolved at a resolution of 2.8 Å using X-ray crystallography. The structural analysis was performed with CCP4i and Coot software. **Results** The overall structure of Dys1 was a tetramer, each monomer containing a catalytic site and a cofactor NAD<sup>+</sup> binding site. The core region of the monomer adopted a Rossmann fold. The amino acid residues involved in the substrate binding sites were highly conserved among eukaryotes. **Conclusion** The crystal structure of Dys1 is being resolved for the first time. It reveals the binding mode of the cofactor NAD<sup>+</sup> to the enzyme and confirms that the enzyme functions as a tetramer, with the N-terminus serving as an essential modulator for its catalytic activity.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*; deoxyhypusine synthase; protein expression and purification; crystal structure; X-ray diffraction