



专题论述



丝组二肽——现代蛋白酶分子进化过程中的原始雏形

刘艳^①, 林铭堃^①, 陈培燕^①, 留筱厦^①, 杜海莲^②, 麻远^③, 赵玉芬^{①③*}^① 化学生物学福建省重点实验室, 厦门大学化学化工学院化学生物学系化学系, 厦门 361005^② 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室; 厦门大学生命科学学院生物医学系, 厦门 361005^③ 生物有机磷及化学生物学教育部重点实验室; 清华大学化学系, 北京 100084

*通讯作者: E-mail: yfzhao@xmu.edu.cn

收稿日期: 2011-01-22; 接受日期: 2011-02-15

doi: 10.1360/032011-66

摘要 系统阐述了我们实验室近十五年来对丝组二肽的生物活性的研究. 丝组二肽是目前报道的具有多种切割活性的最小活性肽, 它不仅能够切割 DNA, 而且可以切割蛋白质及羧酸酯. 丝组二肽是迷你的磷酸酯酶和蛋白水解酶, 是现代蛋白酶分子进化过程中的原始雏形.

关键词
丝组二肽
核酸切割
蛋白切割
蛋白酶的分子进化

1 引言

多种天然蛋白酶的活性中心都含有两个关键氨基酸, 即丝氨酸和组氨酸, 它们相互协作, 直接参与各种酶促反应^[1-8]. 在酶促反应过程中, 丝氨酸侧链羟基通常作为亲核试剂参与反应, 而组氨酸侧链含有咪唑基团, 作为质子的给体或受体, 两者协同参与丝氨酸蛋白水解酶, 如糜蛋白酶、胰蛋白酶及弹性蛋白酶的肽键及酯键的水解反应^[1, 9-11]. 虽然在丝氨酸蛋白水解酶^[1]、脂肪酶^[3]、酯酶^[6]的活性中心, 天冬氨酸与丝氨酸、组氨酸形成一个三元催化活性中心, 但是, 丝氨酸和组氨酸二联体也能表现出有效的水解反应活性^[8, 12].

丝氨酸、组氨酸二联体在蛋白酶活性中心具有高度的保守性及重要的催化功能性, 而且多肽酶具有现代蛋白酶的最原始的功能基础. 那么, 将蛋白酶活性中心的丝氨酸与组氨酸键合成丝氨酰组氨酰胺, 即丝组二肽 (Ser-His), 其是否具有蛋白酶相似的生物活性呢? 我们实验室近十五年来对 Ser-His 的生物活性进行系统的研究, 发现 Ser-His 是目前报道的具

有多种切割活性的最小的活性肽. 它不仅能够切割 DNA, 而且可以切割蛋白质及羧酸酯, 它是迷你的磷酸酯酶和蛋白水解酶, 是现代蛋白酶分子进化过程中的原始雏形.

2 Ser-His 对 DNA 的切割活性

2.1 Ser-His 对 DNA 切割活性的发现

我们实验室早期在研究 *N*-磷酸化氨基酸与 DNA 的相互作用时, 发现久置的 *N*-磷酸化丝氨酸的饱和组氨酸缓冲溶液能够切割 DNA, 而新配的溶液则不具有此活性. 后来证明久置溶液中的真正活性成分是 Ser-His^[13]. 将线形的噬菌体λ-DNA 或环形的质粒 DNA pBR322 与 Ser-His 在恒温水浴中保温 72 h 后, 两者都可以被逐渐降解成长短不同的小碎片^[14]. Ser-His 可以在一个较宽的 pH 范围 (pH = 5~9) 内切割 DNA, 在生理温度 37 °C 保温时, 最佳的切割 pH = 6, 接近组氨酸侧链咪唑基的 pKa (pH = 6). 此外, 切割反应的快慢跟保温温度有关, 在 50 °C 保温条件下的

切割速度要比生理温度 37 °C 要快得多. 通过 ^{32}P 同位素自显影技术标记 DNA 底物, 发现 Ser-His 对 DNA 切割不具有序列选择性.

Ser-His 对 DNA 的切割活性是否是实验样品污染的核酸酶或金属离子引起的? 过滤消毒或压力蒸汽消毒过的 Ser-His 在存在 EDTA 或不存在 EDTA 的条件下与 DNA 进行切割实验研究. 实验结果表明, 无论 EDTA 存在与否, 消毒过的 Ser-His 对 DNA 都具有明显的切割活性, 说明 DNA 的切割并不是因为核酸酶污染. 相同的保温条件下, DNA 溶液中加入不同浓度的 Cu^{2+} 或 Fe^{2+} , 无论 EDTA 存在与否, 如果没有 Ser-His, 都没有对 DNA 产生切割活性. 此外, 不同来源的 Ser-His 及 HPLC 纯的 Ser-His 对 DNA 同样具有切割活性, 说明 DNA 的切割并不是 Ser-His 中的化学品杂质引起. 以上相关实验结果总结于表 1, 其充分说明 Ser-His 对 DNA 具有独特的切割活性.

然而, Ser-His 对 DNA 的切割活性相对于 DNA 核酸酶来说非常弱, 37 °C 条件下, 1.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ser-His 对 DNA 的切割活性相当于 1/1000 的 $7 \times 10^{-3} \text{unit}/\text{mL}$ 的 RQ1 DNA 核酸酶^[15].

2.2 Ser-His 对 DNA 的切割机制及其所含基团在 DNA 切割反应中的作用

T4 DNA 连接酶可以将寡聚核苷酸链的自由 3'-羟基和 5'-磷酸根连接起来, 形成更长的寡聚核苷酸链. 利用 T4 DNA 连接酶处理 Ser-His 切割 DNA 所产生的碎片, 发现所产生的 DNA 碎片可以经 T4 连接酶连成较大的片段^[14, 16]. 这说明 Ser-His 切割 DNA 可以产生自由的 3'-羟基和 5'-磷酸根, 而这些基团的产

表 1 确定 DNA 切割活性根源的相关实验^[14]

反应条件 ^{a)}	DNA 切割活性 ^{d)}
Britton-Robinson buffer (B-R)	-
Ser-His ^{b)} (filter-sterilized)+B-R	+
Ser-His ^{b)} (autoclaved)+B-R	+
Ser-His ^{b)} \pm 1 mM EDTA +B-R	+
Ser-His ^{b)} +B-R at 65 °C	+
FeSO_4 ^{c)} \pm EDTA +B-R	-
CuSO_4 ^{c)} \pm EDTA +B-R	-

a) 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 λ -DNA 与 10mM Ser-His 在 40 mM Britton-Robinson 缓冲液(pH 6.0)中进行反应, 反应溶液终体积 20 μL , 37 °C 或 65 °C 条件下保温; b) 本试验中所用 Ser-His 购自 3 个不同地方, 包括一种 HPLC 纯; c) FeSO_4 和 CuSO_4 溶液浓度分别做了两个浓度点, 1 μM 和 10 μM . d) “-”代表未观测到切割活性; “+”代表观测到切割活性.

生只能通过磷酸二酯键的水解产生. 因此, Ser-His 是以水解机制切割 DNA, 而非通常 DNA 的自由基断裂机制.

为了考察 Ser-His 分子结构中所含基团在 DNA 切割反应中的作用, 将 Ser-His 中的丝氨酸或组氨酸用其他氨基酸残基取代, 或者在两者之间或在 Ser-His 的 N-末端或 C-末端加入一些其它氨基酸残基. 当丝氨酸被除了半胱氨酸(Cys)、苏氨酸(Thr)以外的氨基酸取代时, 其对 DNA 的切割活性消失. 组氨酸若被较大体积的氨基酸残基取代, 比如带正电荷的赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg), 则其切割 DNA 的活性消失. 但是, 若是较小体积的丙氨酸(Ala)取代组氨酸残基, 即 Ser-Ala, 则其切割 DNA 活性保持, 但活性减弱^[17]. 组丝二肽(His-Ser)与 Ser-His 的化学组成相同, 仅序列相反, 但其不具有切割 DNA 的活性. Ser-His 的 N-端加上一个氨基酸残基时, 其切割 DNA 的活性即消失, 但是, 在 C-端加上一个或多个氨基酸残基时, 其切割 DNA 活性保持. 此外, 在 Ser-His 中间加上一个或多个氨基酸残基时, 其切割 DNA 活性同样保持. 以上实验结果充分说明, N-端氨基酸残基的羟基(Ser, Thr)或巯基(Cys)是具有切割 DNA 活性的必需基团, 而组氨酸的咪唑基不是必需基团, 其可以帮助提高其切割活性. 关于咪唑基在酶促反应中的作用, 大量的研究报道已清楚表明^[18-20], 咪唑基不是天然酶切割活性的关键基团, 但是其对于提高其切割活性非常重要. 这一结论正与我们的实验事实相符.

另外, 一系列与 Ser-His 在结构上有不同相似度的物质与 DNA 的切割活性也做了系统研究^[15, 17]. Boc-Ser-His 不具有切割活性, 而羧基端酯化后的 Ser-His-OMe、Ser-OMe、Thr-OMe 仍具有切割活性, 但是其活性降低. 这是因为羧基一旦酯化就降低了 Ser-His 等在水中的溶解度. 另外, 四种醇胺化合物同样具有切割活性. 这些结果说明, 对 DNA 的切割过程, N-端氨基是具有活性的必需基团, 而且氨基与羟基处于相邻碳原子上, 而 C-端的羧基则不是必需基团. 上述相关实验结果总结于图 1 中.

基于对 Ser-His 所含基团对 DNA 切割活性的作用评价, 一种相对 Ser-His 没有羧基的非肽酰胺——丝氨酰组酰胺被设计、合成出来, 其同样具有 DNA 的切割活性^[22, 23].

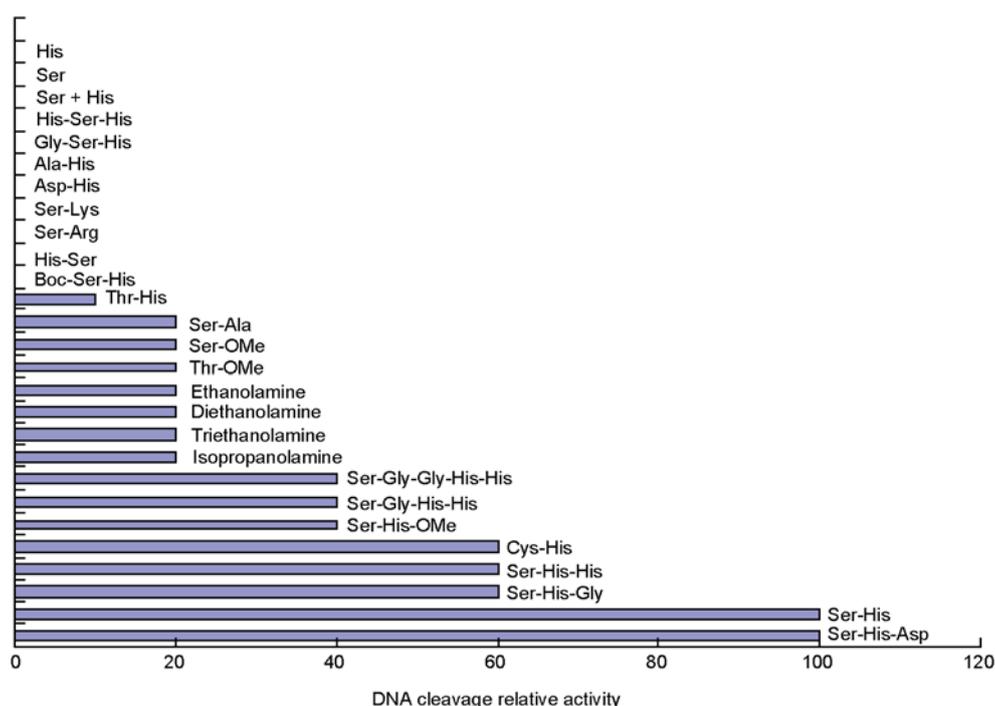


图1 Ser-His 与相关寡肽及结构相关化合物对 DNA 的切割活性^[14, 16, 21]

2.3 Ser-His 对 DNA 的切割作用的分子模拟

利用 Sybyl 工作站中的 FlexiDock 模块构建了一系列二肽, 如 Ser-His, 与寡聚核酸 5'-TpTpdC-3' 的复合物三维结构^[24-26]。研究表明, 复合物中羟基氧原子与磷酸根的磷原子间的合适距离是使 DNA 切割的必需条件。例如, Ser-His 中亲核的羟基氧原子与磷酸根的磷原子间距离为 3.7 Å, 羟基氧原子正好在合适的距离范围, 可以亲核进攻磷酸酯键, 形成一个五配位磷过渡态, 从而使磷酸酯键断裂。

二肽与底物 DNA 作用的另一个关键结构特点是二肽必需同时与 DNA 骨架上的相邻两个磷酸根相结合。例如, Ser-His 与寡聚核酸 5'-TpTpdC-3' 复合物之间, 丝氨酸及组氨酸残基分别与底物 DNA 相邻的上下两个磷酸根通过氢键或者静电力相互作用, 将底物 DNA 与 Ser-His 相互拉近, 利用丝氨酸侧链羟基亲核进攻磷酸根。

通过分子模拟, 结合上述所有的 DNA 切割实验信息, 推出 Ser-His 切割 DNA 的分子机制如图 2 所示。

3 Ser-His 对蛋白质的切割活性研究

作为生物体中最重要的两种物质, 蛋白质和核

酸决定了每一个生物体的共性与特性, 也是生物学的主要研究对象。正如前文所述, 丝氨酸和组氨酸在丝氨酸蛋白酶中是作为活性中心存在, 因此, Ser-His 对蛋白质的切割作用研究同核酸切割一样在理论研究和未来应用上都具有非常重要的意义。

3.1 Ser-His 对蛋白质切割活性的发现

在与切割 DNA 相同的反应条件下, Ser-His 对蛋白质也具有切割活性, 能将牛血清白蛋白(BSA)^[14, 27]、绿色荧光蛋白(GFP)^[28]、亲环素 A (CyPA)^[29]等切割成小的弥散肽段, 而且随着保温时间的延长, 切割现象越明显。切割蛋白质的最优反应条件与切割 DNA 的相似, 在接近 pH = 6 时, 具有最佳的切割效果。切割反应速度的快慢取决于反应温度, 在不使蛋白质变性凝固的前提下, 温度越高, 反应速度越快, 较好的反应温度是 50 °C。

Ser-His 对蛋白质的切割活性是否由于反应体系污染的蛋白水解酶引起的? 为了排除这个疑问, Ser-His 同样进行超滤除菌或蒸汽压力灭菌, 并且对蛋白质切割活性的研究都是实验组和对照组平行进行, 含有 Ser-His 的实验组表现出明显的切割活性, 没有 Ser-His 的对照组则没有变化。此外, 在反应体

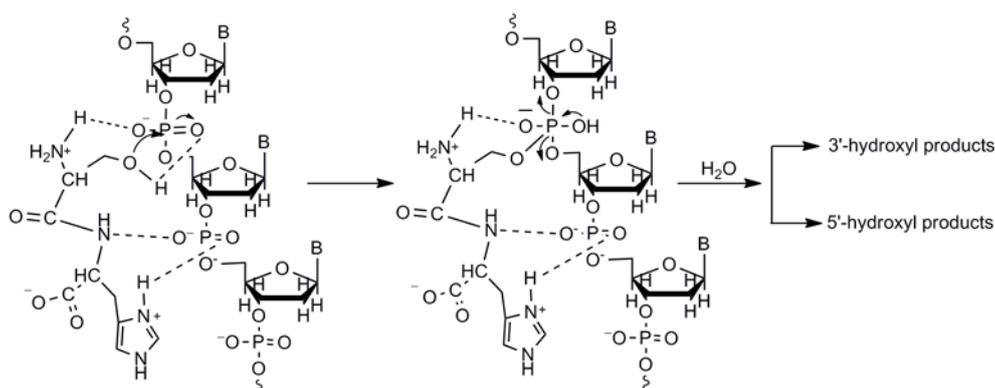


图2 Ser-His 切割 DNA 的可能分子机制^[21] (虚线所示为 Ser-His 与寡聚核酸之间所形成的氢键)

系中加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), 实验组与对照组仍表现出明显差异, 实验组蛋白质被降解为弥散带, 对照组蛋白质条带完整, 没有变化. 以上实验充分说明 Ser-His 对蛋白质具有切割活性. 但是, 这种切割活性相对较弱, 在 50 °C, pH=6.5~7.5 的 B-R 缓冲溶液中, 1 mmol 的 Ser-His 的切割活性相当于 75 个单位的蛋白水解酶 K 的切割活性^[28].

3.2 缓冲溶液对蛋白质切割活性的影响

B-R 缓冲溶液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系、Bis-Tris 缓冲体系与不加缓冲液对比(所有缓冲液均为 pH = 6.0), 60 °C 下反应 24 h, 考察 Ser-His 对 BSA 的切割活性. 实验表明, 这些常用的生化缓冲体系中, B-R 缓冲液及磷酸盐缓冲液对切割有明显的促进作用, 而柠檬酸盐缓冲液与 Bis-Tris 缓冲液则抑制反应进行; 不加缓冲液 (Ser-His 自身具有一定的缓冲能力, 在反应前后 pH 值基本保持在 6.0 左右) 时可看到加 Ser-His 后 BSA 原料带变弱, 但相对 B-R 缓冲液与磷酸盐缓冲液变化并不明显^[30].

3.3 Ser-His 所含基团在蛋白质切割反应中的作用^[30]

为了研究 Ser-His 中各官能团在切割蛋白质时所起的作用, 以一系列与 Ser-His 相似的组丝二肽(His-Ser)、丝丙二肽(Ser-Ala)、丙组二肽(Ala-His)、丝氨酸、组氨酸、丝氨酸甲酯、乙醇胺、二乙醇胺及三乙醇胺为对照, 研究它们对 BSA 的切割作用. 研究表明: (1)Ala-His 无切割活性, 而 Ser-Ala 具有切割活性, 但是相对 Ser-His 活性较弱. 这说明丝氨酸侧链羟基是其具有切割活性的必需基团, 而组氨酸的

咪唑基则辅助增强切割活性. (2)丝氨酸、丝氨酸甲酯、乙醇胺、二乙醇胺及三乙醇胺对 BSA 无切割活性. 这一结果与 DNA 的切割活性相反. 考虑到 Ser-Ala 的微弱活性, 说明二肽中的酰胺键及羧基对其切割活性有一定贡献. 可能是这两种官能团与蛋白质骨架上的某些侧链官能团作用, 从而使 Ser-His 分子接近于蛋白质并使切割成为可能. (3)Ser 与 His 对 BSA 没有明显切割作用, 说明 Ser-His 即使在反应中水解产生 Ser 与 His, 其切割活性也不是由这两种物质引起的. (4)与 Ser-His 化学组成相同但序列相反的 His-Ser, 对蛋白质同样不具有切割活性, 这一结果与切割 DNA 一致. 上述相关实验结果总结于图 3 中.

3.4 Ser-His 与底物蛋白质的非共价相互作用

作为蛋白质切割的初始步骤, Ser-His 与底物蛋白之间的非共价相互作用是个关键阶段. 因此, 研究 Ser-His 与底物蛋白质之间非共价相互作用, 对于理解两者的切割分子机制具有重要意义.

利用 NMR 和分子模拟技术来研究 Ser-His 与底物蛋白亲环素 A 的非共价相互作用^[29]. ¹⁵N-¹H 异核单量子相关谱(HSQC)的研究结果表明, Ser-His 在亲环素 A 上有两个独立的结合域, 每个结合域结合一个 Ser-His 分子, 其解离常数 K_1 、 K_2 分别是 2.07 和 6.66 mmol·L⁻¹. 这说明 Ser-His 与亲环素 A 之间存在特异性的非共价相互作用, 但是这种作用较弱. 这一结果也预示着 Ser-His 对亲环素 A 的切割活性较弱, 而相关的切割实验也证明如此. 根据 NMR 给出的 Ser-His 在亲环素 A 上的结合位点, 采用分子模拟的方法研究两者非共价相互作用的分子机制. 实验结果表明

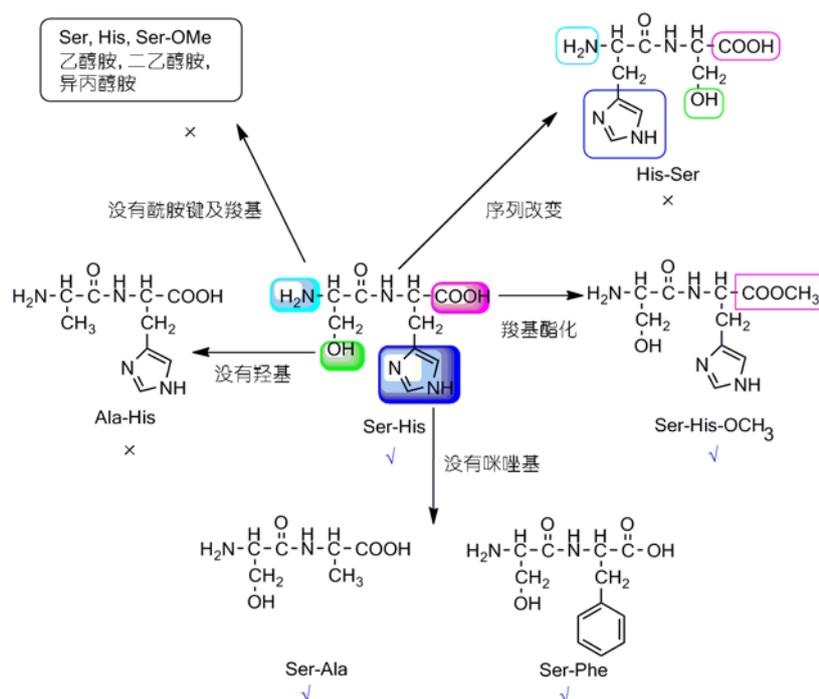


图3 Ser-His 的各种类似物对 BSA 研究的切割作用^[30](√表示具有切割 BSA 活性, ×表示不具有活性)

Ser-His 分子中 α -氨基和侧链羟基是两者相互作用的关键基团, 咪唑基及酰胺键可以起到增强侧链羟基的亲核性, 有利于其亲核进攻底物蛋白质的酰胺键, 从而水解底物蛋白。上述研究结果与前文所述的 Ser-His 所含基团在切割过程中的作用一致。

此外, 利用 CD 光谱及分子对接、量化计算方法详细研究了 Ser-His 与蛋白质 BSA 及溶菌酶的相互作用^[31]。研究表明 Ser-His 与两种蛋白具有较强的相互作用, 通过这种相互作用大大降低了底物蛋白的 β -片层结构的比例。这说明 Ser-His 能选择性的断裂 β -片层结构间的氢键。Ser-His 与 BSA 的不同二级结构片段的分子对接研究表明, Ser-His 侧链羟基与 β -片层结构中的底物酰胺键羰基之间具有匹配的作用距离, 3.37 Å, 有利于其亲核进攻水解底物蛋白。

3.5 Ser-His 与底物蛋白质相互作用的双功能性

在研究 Ser-His 对亲环素 A 的切割活性时, 发现随着保温时间的延长(pH = 6, 37 °C), 除了切割产物外, 还观察到较亲环素 A 本身分子量更大的蛋白条带的产生, 如图 4^[29]所示, 其可能是偶联产物。Ser-His 是否具有催化酰胺键生成的功能? 基于微观可逆原理, 蛋白水解酶, 如糜蛋白酶或 Ser-His 应该具有催化肽键形成的能力^[32, 33]。意大利的 Pier Luigi Luisi 教授研究发现 Ser-His 能够催化肽键及核酸 PNA 的生成^[34]。这一文献结果间接证明 Ser-His 在切割底物蛋白时有偶联产物生成的推断。因此, 我们认为 Ser-His 对底物蛋白质的相互作用具有双功能性, 其详细的作用分子机制正在进一步研究。

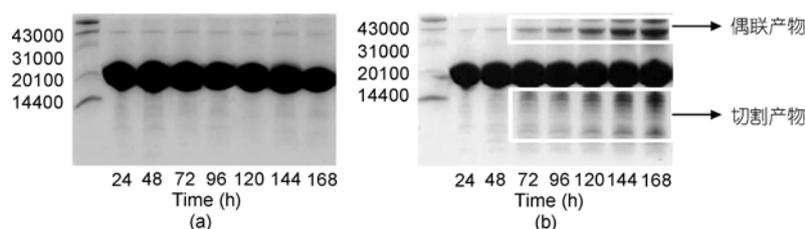


图4 Ser-His 对亲环素 A 的切割活性^[29], (a) 对照组, 没有 Ser-His; (b) 实验组

4 Ser-His 对羧酸酯的切割活性

丝氨酸蛋白水解酶糜蛋白酶不仅能够水解蛋白质, 还能水解羧酸酯. Ser-His 像一个迷你的丝氨酸蛋白水解酶, 它也能水解对硝基苯酚乙酸酯(*p*-NPA). Ser-His 在室温条件下与 *p*-NPA 一起保温时, 随着时间的延长, 在 400 nm 波长下的光密度 OD 值成线性增长, 而且, OD 值变化的快慢与 Ser-His 的反应浓度、反应 pH 及反应温度有关. 这一现象充分说明 *p*-NPA 被逐渐水解为对硝基苯酚^[14].

5 总结

Ser-His 是世界上最小的具有多种生物功能的活性肽, 其能在较广的 pH 及温度范围内以水解机制切割 DNA、蛋白质以及对硝基苯乙酸酯. Ser-His 及相关类似

物的多种生物活性详细总结于表 2 中^[14, 15, 17, 21, 23, 30, 35].

尽管 Ser-His 的切割活性较弱, 它的这一特性可能与蛋白水解酶及磷酸酯酶的起源和演化有关, 是化学进化过程中酶的雏形. 由于丝氨酸是前生命氨基酸^[36, 37], 而组氨酸不是, Ser-His 在生命起源与进化的初期是否存在或许存在争议. 然而, 目前有许多关于组氨酸的前生命合成的报道^[38]. 因此, Ser-His 是可能存在于前生命.

在 Ser-His 的两个氨基酸残基中间增加氨基酸或在其 C-端增加氨基酸时, 其仍具有相应的切割活性. 这说明 Ser-His 具有非凡的进化能力. 由于天然氨基酸所能提供的功能基团相对较少, 使得多肽酶进化可用的具有催化活性的有效组合非常有限. 丝氨酸与组氨酸的成功组合正是大自然对酶的不同功能基团重复选择的结果.

表 2 Ser-His 及其相关类似物的多种生物活性总表^[14, 15, 17, 21, 23, 30, 35]

Entry	Ser-His and analogues	Substrate			Entry	Ser-His and analogues	Substrate		
		DNA	Protein	<i>p</i> -NPA			DNA	Protein	<i>p</i> -NPA
1	乙醇胺	+	-	/	17	Cys-His	+	+	/
2	二乙醇胺	+	-	/	18	Thr-His	+	+	/
3	三乙醇胺	+	-	/	19	Asp-His	-	-	/
4	异丙醇胺	+	/	/	20	Ala-His	-	-	/
5	乙胺+乙醇	-	/	/	21	Ser-His-Asp	+	+	/
6	Ser	-	-	/	22	Ser-Gly-His-His	+	+	/
7	His	-	-	/	23	Ser-Gly-Gly-His-His	+	+	/
8	Ser+His	-	-	/	24	His-Ser	-	-	/
9	Ser-His	+	+	+	25	Ser-His+Fe ²⁺	+	+	/
10	Ser-Ala	+	+	/	26	Ser-His+Cu ²⁺	+	-	/
11	Ser-Arg	-	-	/	27	D-Ser-L-His-OMe	/	-	/
12	Ser-Lys	-	-	/	28	D-Ser-D-His-OMe	/	-	/
13	Ser-OMe	+	-	/	29	L-Ser-D-His-OMe	/	+	/
14	Ser-His-OMe	+	+	/	30	Ser-D-Phe	/	+	/
15	Boc-Ser-His	-	-	/	31	L-Ser-Hism	+	/	/
16	Thr-OMe	+	/	/	32	D-Ser-Hism	-	/	/

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20132020, 20732004, 20805037)、教育部基金(200803841009)及福建省重点科技项目(2001F008)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Steitz TA, Shulman RG. Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1982, 11: 419-444
- Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN. Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol*, 1985. 182: 317-329
- Brady L, Brzozowski, AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L. A

- serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 1990, 343(6260): 767–770.
- 4 Contreras JA, Karlsson M, Osterlund T, Laurell H, Svensson A, Holm C. Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31426–31430
 - 5 Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 1991, 351(6329): 761–764
 - 6 Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, 253(5022): 872–879
 - 7 Anthonsen HW, Baptista A, Drablos F, Martel P, Petersen SB, Sebastiao M, Vaz L. Lipases and esterases: A review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol Annu Rev*, 1995, 1: 315–371
 - 8 Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*, 2002, 102(12): 4501–4524
 - 9 Carter P, Wells JA. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*, 1988, 332(6164): 564–568
 - 10 Corey DR, Willett WS, Coombs GS, Craik CS. Trypsin specificity increased through substrate-assisted catalysis. *Biochemistry*, 1995, 34(36): 11521–11527
 - 11 Craik CS, Rocznik S, Largman C, Rutter WJ. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science*, 1987, 237(4817): 909–913
 - 12 Paetzel M, Dalbey RE. Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22(1): 28–31
 - 13 Ma Y. Studies on synthesis and characteristics of *N*-phosphoamino acids, Tsinghua University PhD. Dissertation. 1996.
 - 14 Li YS, Zhao YF, Hatfield S, Wan R, Zhu Q, Li XH, McMills M, Ma Y, Li J, Brown KL, He C, Liu F, Chen XZ. Dipeptide seryl-histidine and related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester. *Bioorg Med Chem*, 2000, 8(12): 2675–2680
 - 15 Wan R. Studies on the DNA Cleavage Mechanism by seryl-histidine Dipeptide, Tsinghua University, PhD. Dissertation. 2000.
 - 16 Wan R, Wang N, Zhao YF. Studies on DNA cleaved by seryl-histidine dipeptide. *Chem J Chinese U*, 2001, 22(4): 598–600
 - 17 Wan R, Wang N, Zhao G, Zhao YF. Seryl-histidine dipeptide side chains effects on its DNA cleavage reaction. *Chem J Chinese U*, 2000, 21(12): 1864–1866
 - 18 Reddy PR, Rao KS, Mohan SK. Copper(II) complexes containing *N,N*-donor ligands and dipeptides act as hydrolytic DNA-cleavage agents. *Chem Biodivers*, 2004, 1(6): 839–853
 - 19 Santoro SW, Joyce GF, Sakthivel K, Gramatikova S, Barbas CF. RNA cleavage by a DNA enzyme with extended chemical functionality. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(11): 2433–2439
 - 20 Beloglazova NG, Fabani MM, Zenkova MA, Bichenkova EV, Polushin NN, Sil'nikov VV, Douglas KT, Vlassov VV. Sequence-specific artificial ribonucleases. I. Bis-imidazole-containing oligonucleotide conjugates prepared using precursor-based strategy. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(13): 3887–3897
 - 21 Ma Y, Chen X, Sun M, Wan R, Zhu C, Li Y, Zhao Y. DNA cleavage function of seryl-histidine dipeptide and its application. *Amino Acids*, 2008, 35(2): 251–256
 - 22 Sun M, Zhu CJ, Tan B, Jin Y, Zhao YF. Molecular modeling of diastereoisomeric aggregates of *L/D* ser/histamine amide with 5'-TpTpdC-3'. *J Mol Model*, 2003, 9(2): 84–87
 - 23 Zhu CJ, Lu Y, Du HL, Jinag YY, Zhao YF. A pair of new enantiomeric amides with DNA-cleaving function. *Chem J Chinese U*, 2004, 25(6): 1065–1068
 - 24 Sun M, Ma Y, Ji SH, Liu HN, Zhao YF. Molecular modeling on DNA cleavage activity of seryl-histidine and related dipeptide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(14): 3711–3714
 - 25 Liu XH, Sun M, Cheng CM, Zhao YF. Theoretical study on aggregates of seryl-histidine and histidyl-serine dipeptide with 5'-TpTpdC-3'. *Orig Life Evol B*, 2006, 36(3): 263–265
 - 26 Zhong RG, Zhao LJ, Zhao YF. A QM-MM study on DNA cleavage by seryl-histidine dipeptide. *Acta Chimica Sinica*, 2004, 62(24): 2444–2446
 - 27 Chen J, Wan R, Liu H, Cheng CM, Zhao YF. Cleavage of BSA by a dipeptide seryl-histidine. *Lett Pept Sci*, 2000, 7(6): 325–329
 - 28 Du HL, Wang YT, Yang LF, Luo WX, Xia NS, Zhao YF. Appraisal of green fluorescent protein as a model substrate for seryl-histidine dipeptide cleaving agent. *Lett Pept Sci*, 2002, 9(1): 5–10
 - 29 Liu Y, Shi YH, Liu XX, Lin MK, Lin DH, Zhao YF. Evaluation of non-covalent interaction between seryl-histidine dipeptide and cyclophilin A using NMR and molecular modeling. *Sci China Chem*, 2010, 53(9): 1987–1993
 - 30 Chen J, Wan R, Liu H, Jiang YY, Zhao YF. Studies on the cleavage of bovine serum albumin by Ser-His. *Chem J Chinese U*, 2001, 22(8):

1349–1351

- 31 Zeng Q, Yin Q, Zhao YF. The study on the interaction between seryl-histidine dipeptide and proteins by circular dichroism and molecular modeling. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(7): 2679–2689
- 32 Luthi P, Luisi PL. Enzymatic synthesis of hydrocarbon-soluble peptides with reverse micelles. *J Am Chem Soc*, 1984, 106: 7285–7286
- 33 Jakubke HD, Kuhl P, Könecke A. Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1985, 24: 85–93
- 34 Gorlero M, Wieczorek R, Adamala K, Giorgi A, Schinina ME, Stano P, Luisi PL. Ser-His catalyses the formation of peptides and PNAs. *Febs Lett*, 2009, 583(1): 153–156
- 35 Chen J. Department of Chemistry, Some Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry and the Study of Cleavage of BSA by Seryl-Histidine, Tsinghua University, PhD. Dissertation, 2002
- 36 Miller SL. *The Endogenous Synthesis of Organic Compounds*. In: Brack A. Ed. *The molecular origins of life. Assembling pieces of the puzzle*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998
- 37 Al'tshtein AD, Efimov AV, Physico-chemical basis of the genetic code origin: Stereochemical analysis of interactions of amino acids and nucleotides based on the progene hypothesis. *Mol Biol (Mosk)*, 1988, 22(5): 1411–1429
- 38 Shen C, Yang L, Miller SL, Oro J. Prebiotic synthesis of histidine. *J Mol Evol*, 1990, 31(3): 167–174

Seryl-histidine dipeptide: An original molecule evolutionary model of modern protease

LIU Yan¹, LIN MingKun¹, CHEN PeiYan¹, LIU XiaoXia¹, DU HaiLian², MA Yuan & ZHAO YuFen^{1,3}

1 Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Department of Chemical Biology, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering; School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3 Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology, Ministry of Education, Department of Chemistry, School of Life Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: We summarize the multiple cleavage activities of seryl-histidine dipeptide (Ser-His). Ser-His itself can cleave DNA, protein and a carboxyl ester. It is proposed that Ser-His is an original molecule evolutionary model of modern protease.

Keywords: seryl-histidine dipeptide, DNA cleavage, protein cleavage, molecule evolution of protease