

Bài báo nghiên cứu

TĂNG CƯỜNG HOẠT HÓA ENZYME CASPASE-9
BỞI TRÌNH TỰ DNA CHỨA HAI CẤU TRÚC G-QUADRUPLEX

Đặng Thanh Dũng

Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tác giả liên hệ: Đặng Thanh Dũng – Email: dung.dthanh@ou.edu.vn

Ngày nhận bài: 14-4-2023; ngày nhận bài sửa: 10-5-2023; ngày duyệt đăng: 17-5-2023

TÓM TẮT

Caspase-9 đóng vai trò quan trọng trong quá trình chết của tế bào. Trong tế bào, caspase-9 tồn tại ở trạng thái đơn phân không hoạt tính, và trở nên có hoạt tính khi ở trạng thái dimer. Do đó, kiểm soát sự dimer của caspase-9 giúp cho kiểm soát được hoạt tính của caspase-9. Trong nghiên cứu này, hoạt tính của caspase-9 được hoạt hóa bởi trình tự DNA chứa hai cấu trúc G-quadruplex (DNA2G4). Caspase-9 được dung hợp với peptide RHAU23 bằng kỹ thuật sinh học phân tử tạo nên protein tái tổ hợp RHAU23-caspase-9. RHAU23-caspase-9 được biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli* dưới sự cảm ứng của IPTG và được tinh chế bằng sắc ký ái lực với cột His. Kết quả cho thấy DNA2G4 khả năng cảm ứng sự dimer của RHAU23-caspase-9 thông qua tương tác đặc hiệu giữa RHAU và G4, dẫn đến kích thích hoạt tính của enzyme. Sự hoạt hóa RHAU23-caspase-9 bởi DNA2G4 giúp hoạt tính enzyme tăng hoạt tính lên khoảng 2,0 lần so với hoạt tính của RHAU23-caspase-9. Kiểm soát hoạt tính của caspase-9 có tiềm năng trong việc ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư.

Từ khóa: hoạt hóa; dimer; DNA2G4; Enzyme; RHAU23-caspase-9

1. Giới thiệu

Caspase-9 là một enzyme quan trọng trong quá trình gây chết của tế bào, thuộc nhóm caspase chịu trách nhiệm phân cắt protein tại vị trí aspartate (Kuida, 2000; Marsden et al., 2002; Pan, O'Rourke, & Dixit, 1998; Yin et al., 2006). Trong tế bào, caspase-9 tồn tại chủ yếu ở dạng đơn phân không hoạt động, caspase-9 hoạt động khi được kích hoạt bởi các yếu tố phụ trợ khác (Gyrd-Hansen et al., 2006; Pop, Timmer, Sperandio, & Salvesen, 2006; Rosier et al., 2020; Wu et al., 2016). Ví dụ: apoptosome, bao gồm yếu tố kích hoạt protease apoptotic 1 (Apaf-1) và cytochrom c (từ ti thể) chịu trách nhiệm thu nhận các caspase-9 đơn phân lại với nhau để tăng số lượng protein theo hướng hoạt hóa dimer. Sau khi được kích hoạt, casp-9 bắt đầu cắt và hoạt hóa procaspase-3 gây ra quá trình chết của tế bào (Pop et al., 2006; Wu et al., 2016).

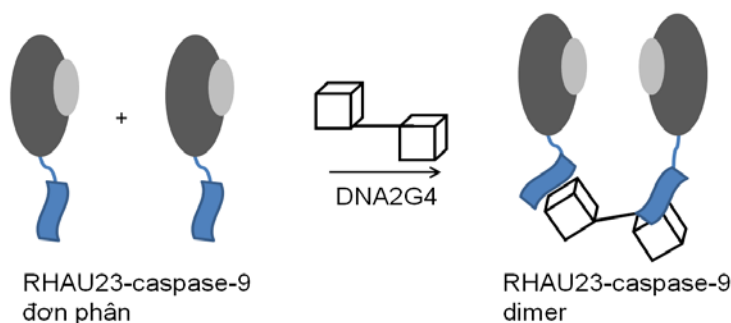
Cite this article as: Dang Thanh Dung (2023). Enhancement of caspase-9 enzyme activity by using DNA bearing 2 G-quadruplexes. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 20(5), 799-807.

Caspase-9 tồn tại chủ yếu ở trạng thái đơn phân không hoạt động trong dung dịch, do đó để hoạt hóa hoạt tính của enzyme này cần có phương pháp tạo nên sự dimer của chúng. Nhiều phương pháp hoạt hóa caspase-9 đã được nghiên cứu. Sử dụng phương pháp đột biến bề mặt tạo vùng kỵ nước có thể giúp hoạt hóa caspase-9 (Chao et al., 2005). Thay vùng 5 amino acids Gly⁴⁰²-Cys-Phe-Asn-Phe⁴⁰⁶ của caspase-9 bằng 5 amino acid Cys²⁶⁴-Ile-Val-Ser-Met²⁶⁸ đã tạo nên vùng kỵ nước trên bề mặt, điều này giúp cho caspase-9 có thể chuyển từ đơn phân thành dimer giúp cho caspase-9 có hoạt tính. Ngoài ra, sử dụng phân tử dạng vòng có thể cảm ứng sự dimer và hoạt hóa caspase-9 (Dang, Nguyen, Merckx, & Brunsveld, 2013). Dung hợp caspase-9 với peptide phenylalanine-glycine-glycine (FGG) tại đầu N tạo nên protein tái tổ hợp FGG-caspase-9. Phân tử dạng vòng cucurbit[8]uril có khả năng cảm ứng sự dimer hóa của FGG-caspase-9, giúp enzyme này chuyển từ trạng thái đơn phân bất hoạt sang trạng thái dimer hoạt tính. Do đó, khám phá ra phân tử có khả năng kiểm soát hoạt tính của caspase-9 là điều cần thiết. Trong nghiên cứu này, phân tử DNA chứa 2 cấu trúc G-quadruplex được sử dụng để hoạt hóa hoạt tính enzyme của caspase-9.

DNA G-quadruplex (G4) là cấu trúc bậc 2 được hình thành từ vùng trình tự giàu G tương tác với nhau tạo nên bề mặt G-tetrad, những bề mặt G-tetrad xếp chồng lên nhau tạo nên cấu trúc G4 (Gellert, Lipsett, & Davies, 1962; Sen & Gilbert, 1988). Cấu trúc G4 có tính đa hình cao được phân loại song song (4 sợi chạy cùng chiều) và không song song (2 sợi chạy cùng chiều và 2 sợi chạy ngược chiều hoặc 3 sợi chạy cùng chiều và 1 sợi chạy ngược chiều) (Burge, Parkinson, Hazel, Todd, & Neidle, 2006; Patel, Phan, & Kuryavyyi, 2007). Phân tích sự hình thành cấu trúc G4 bằng phần mềm máy tính cho thấy bộ gen người có thể chứa hơn 700 ngàn trình tự giàu G có khả năng hình thành cấu trúc G4 (Chambers et al., 2015; Hansel-Hertsch, Spiegel, Marsico, Tannahill, & Balasubramanian, 2018). G4 tập trung chủ yếu ở vùng telomere (Bao, Liu, & Xu, 2019). Ngoài ra, G4 có thể được tìm thấy tại các vùng promoter (Balasubramanian, Hurley, & Neidle, 2011; Lago et al., 2021) và vùng không dịch mã của RNA (Jodoin, Carrier, Rivard, Bisailon, & Perreault, 2019; Kumari, Bugaut, Huppert, & Balasubramanian, 2007; Ma et al., 2023; Sahakyan, Murat, Mayer, & Balasubramanian, 2017). Ngoài gen người, G4 còn hiện diện ở bộ gen vi khuẩn, virus và nấm men. Sự hình thành G4 có khả năng ức chế các quá trình sinh học như sao chép, phiên mã, dịch mã và duy trì telomere. Do đó, G4 được xem là mục tiêu cho việc thiết kế các phân tử đặc hiệu có khả năng bám đặc hiệu vào cấu trúc này (Duchler, 2012; Ou et al., 2008).

Gần đây, phân tử RHAU peptide đã được chứng minh có khả năng bám đặc hiệu vào cấu trúc G4 (Dang, Nguyen, Truong, Nguyen, & Phan, 2021; Dang & Phan, 2016; Heddi, Cheong, Martadinata, & Phan, 2015; Nguyen & Dang, 2023). RHAU protein thuộc nhóm helicase có khả năng nhận diện và tháo xoắn cấu trúc G4. RHAU gồm 1008 amino acids chứa các vùng nhận diện và tháo xoắn. Trong đó, vùng nhận diện chứa vùng bám đặc hiệu vào cấu trúc G4 song song. Sử dụng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) để nghiên cứu khả năng tương tác giữa 18 amino acid của peptide RHAU và G4 cho thấy peptide

RHAU bám kẹp vào bề mặt G-tetrad của G4 thông qua tương tác điện tích giữa 3 amino acids mang điện tích dương của peptide và nhóm photphat mang điện tích âm của G4 (Heddi et al., 2015). Dung hợp peptide RHAU với các protein chức năng cho phép nhận diện và bám đặc hiệu vào G4 đồng thời thực hiện các chức năng của protein. Ví dụ, dung hợp RHAU với protein huỳnh quang tạo nên phân tử dò huỳnh quang có khả năng phân nhận diện và phân biệt giữa cấu trúc G4 song song và không song song. Dung hợp RHAU vào nuclease FokI hay RNase HI cho phép nuclease có khả năng nhận diện cấu trúc G4 và thực hiện chức năng cắt DNA hay RNA tại các vị trí đặc hiệu (Dang et al., 2021; Dang & Phan, 2019). Trong nghiên cứu này, RHAU được dung hợp vào enzyme caspase-9 tạo nên protein tái tổ hợp RHAU23-caspase-9. Sự dimer của RHAU23-caspase-9 bởi DNA chứa 2 cấu trúc G-quadruplex (DNA2G4) dẫn đến hoạt hóa hoạt tính của enzym (Hình 1). Sự tương tác đặc hiệu giữa RHAU và DNA2G4 có khả năng cảm ứng sự dimer và hoạt hóa những protein chức năng khác.



Hình 1. Mô hình cảm ứng sự dimer của RHAU23-caspase-9 bởi phân tử DNA2G4

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Dòng hóa plasmid chứa gen mã hóa protein RHAU23-caspase-9

DNA mã hóa protein RHAU23-caspase-9 được tạo ra bằng phương pháp dung hợp peptide RHAU23 vào enzyme caspase-9. DNA mã hóa cho caspase-9 được nhân lên bằng PCR với khung caspase-9 và cặp mồi ON1: 5'-tggcagatctagcggcgccagcgggtggcggtgctcttgagagtttg-3' ON2: 5'-ccagactcgagttatcagtgctggccgctgatgttttaag-3'. Sản phẩm PCR được xử lý với 2 enzyme cắt giới hạn *Bgl*III/*Xho*I và được nối vào vector (được mở vòng cùng 2 loại enzyme cắt giới hạn) bằng enzyme nối T4 ligase, tạo nên plasmide chứa gen mã hóa protein RHAU23-caspase-9. Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 α khả nạp và kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc. Sau đó, trình tự DNA mã hóa protein mục tiêu được giải bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc).

Biểu hiện và tinh chế protein RHAU23-caspase-9

Plasmid chứa gen mã hóa protein RHAU23-caspase-9 sau khi đã giải trình tự được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3, New England BioLabs). Vi khuẩn *E. coli* được nuôi trong môi trường LB chứa 100 μ g / ml kháng sinh ampicillin và tế bào được nuôi cấy ở 37 $^{\circ}$ C, lắc 200 vòng/ phút đến OD₆₀₀ đạt 0,6. Sau đó IPTG được thêm vào môi trường nuôi

cây với nồng độ cuối cùng là 0,3 mM. Các tế bào được nuôi cấy qua đêm ở 16°C, lắc 190 vòng/ phút trước khi thu hoạch tế bào. Dung dịch chiết xuất protein bugBuster (Merck, Germany) cộng với benzonase nuclease được cho vào sinh khối tế bào và ủ trong vòng 20 phút để phá vách tế bào. Sau đó, phần không hòa tan được loại bỏ bằng cách li tâm ở 20.000 vòng/ phút trong 1 giờ 30 phút ở 4 °C. Phần hòa tan được cho qua cột chứa hạt Nikel thông qua dòng chảy trọng lực. Sau đó, cột được rửa bằng 20 thể tích cột với 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl và 10 mM imidazole đệm, pH 7. Các protein được li giải bằng dung dịch đệm 20mM Tris-HCl, 50 mM NaCl và 200mM imidazol. Imidazole trong dung dịch protein được loại bỏ bằng cách li tâm bằng bộ lọc li tâm Amicon Ultra-15 (EMD Milipore). Protein tinh khiết được thu nhận và phân tích độ tinh sạch bằng SDS-PAGE.

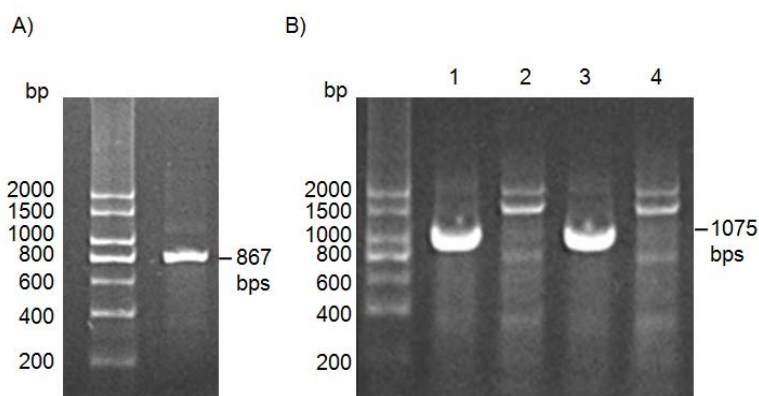
Khảo sát hoạt tính của RHAU23-caspase-9 trên cơ chất tự nhiên (caspase-3)

Các thí nghiệm được tiến hành với hỗn hợp gồm 0,4 μM RHAU23-caspase-9 và 4 μM cơ chất tự nhiên caspase-3 trong trường hợp không có hoặc có bổ sung 4 μM DNA2G4 được pha loãng trong dung dịch đệm xét nghiệm có 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM TCEP (pH 6,5). Các phản ứng được ủ ở 37 °C. Các mẫu được thუნhận trong các khoảng thời gian 0, 0.5, 1, 2 và 4 giờ và các phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung dung dịch nạp mẫu SDS. Tất cả các mẫu được phân tách trên gel SDS 8 đến 18% và các protein được phát hiện bằng thuốc nhuộm xanh coomassie. Việc xác định hiệu quả xúc tác của casp-9 dựa trên nồng độ enzyme cần thiết để cắt một nửa cơ chất trong một thời gian nhất định theo phương trình: $K_{cat}/K_M = \ln 2/[E]1/2.t$. Trong đó k_{cat}/K_M : hiệu suất xúc tác, $[E]1/2$: nồng độ enzyme cắt một nửa cơ chất và t : thời gian ủ.

3. Kết quả và thảo luận

Dòng hóa plasmid chứa gen mã hóa protein RHAU23-caspase-9

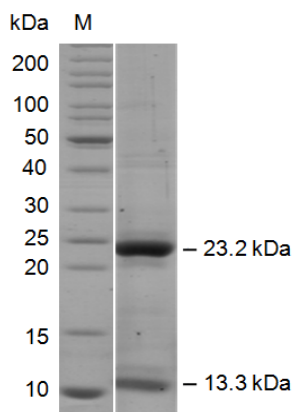
Đoạn gen *Caspase-9* được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi ON1 và ON2 lần lượt chứa các vị trí cắt enzyme *Bgl*III và *Xho*I. Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose (2%) cho thấy một vạch sáng nằm giữa 2 vạch 800 bp và 1000 bp của thang DNA (Hình 2A), tương ứng với kích thước lí thuyết của đoạn gen *caspase-9* là 867 bp. Kết quả này cho thấy đã thành công thu nhận đoạn gen *caspase-9* mục tiêu. Sản phẩm PCR được nối vào plasmid pRHAU23-CFP tại vị trí *Bgl*III và *Xho*I và biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α. Chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp mọc trên môi trường kháng sinh Ampicillin được kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc. Phân tích kết quả điện di cho thấy có vạch sáng xuất hiện ở giữa thang 1000 bp và 1500 bp, tương ứng với kích thước thiết kế là 1075 bp (Hình 3B). Plasmid sau đó được kiểm tra bằng giải trình tự bởi Công ti Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự tương đồng 100% với trình tự lí thuyết (dữ liệu không được hiển thị) cho thấy đã thành công tạo ra vector tái tổ hợp mang gen mã hóa cho protein mục tiêu RHAU23-caspase-9.



Hình 2. Điện di agarose. A) Sản phẩm PCR của caspase-9 (867 bps). B) Sản phẩm PCR khuẩn lạc 1, 2, 3, 4 trong đó khuẩn lạc số 1 và 3 cho kích thước tương ứng với lý thuyết 1075 bps

Biểu hiện và tinh chế protein RHAU23-caspase-9

Protein RHAU23-caspase-9 được biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3) dưới sự cảm ứng của chất cảm ứng IPTG. Protein được tinh chế bằng sắc ký ái lực sử dụng cột His. Độ tinh sạch của protein được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Kết quả điện di cho thấy xuất hiện 2 vạch: vạch lớn có kích thước nằm giữa 20 kDa và 25 kDa của thang, vạch nhỏ nằm trên kích thước 10 kDa của thang, tương ứng với kích thước lý thuyết của caspase-9 lần lượt là 23,2 kDa và 13,3 kDa (Hình 3). Từ đây có thể cho thấy đã thành công trong việc thu nhận protein RHAU23-caspase-9. Phân tích độ tinh sạch bằng phần mềm AlphaEaseFC cho thấy protein có độ tinh sạch khoảng 90%, protein được bảo quản ở nhiệt độ -80°C và được sử dụng để khảo sát hoạt tính.

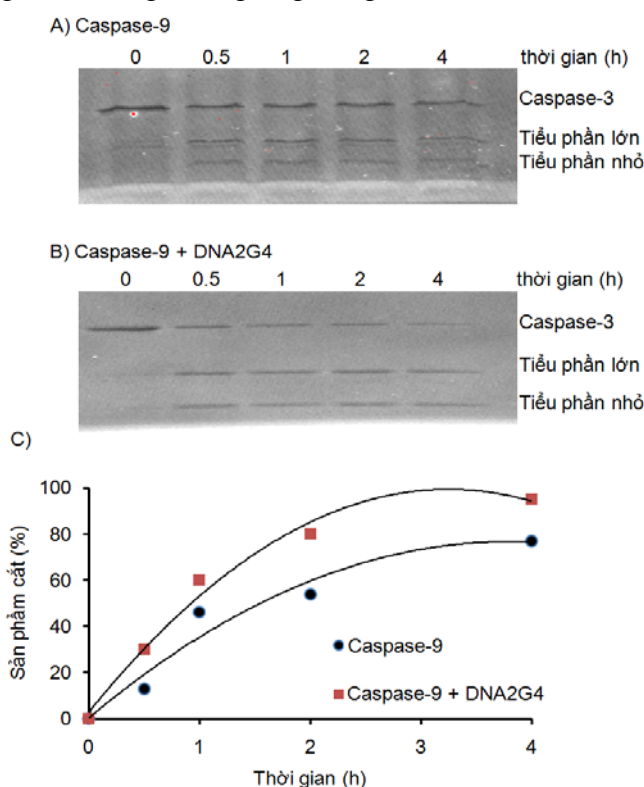


Hình 3. Điện di SDS protein RHAU23-caspase-9, M: thang protein, RHAU23-caspase-9: tiểu phần lớn (23.2 kDa) và tiểu phần nhỏ (13.3 kDa)

Hoạt hóa RHAU23-caspase-9 bởi DNA2G4

Hiệu quả xúc tác của RHAU23-caspase-9 được xác định trên cơ chất tự nhiên (caspase-3). RHAU23-caspase-9 ($0.4\ \mu\text{M}$) cắt cơ chất caspase-3 ($4\ \mu\text{M}$) tại vị trí đặc hiệu tạo ra sản phẩm gồm 1 tiểu phần lớn và 1 tiểu phần nhỏ. Sản phẩm cắt được phân tích trên điện di SDS

với thuốc nhuộm xanh coomassie. Thời gian enzyme cắt 50% cơ chất được xác định bằng phần mềm AlphaEaseFC. Kết quả cho thấy RHAU23-caspase-9 mất khoảng 1,55 giờ để cắt được 50% lượng cơ chất, tương ứng với hiệu quả xúc tác (K_{cat}/K_M) khoảng $1,1 \mu M^{-1}h^{-1}$ (Hình 4A, C). Hiệu quả xúc tác của RHAU23-caspase-9 tương đương với hiệu quả cắt của caspase-9 đã được báo cáo trước đây, điều này cho thấy vùng RHAU23 không ảnh hưởng đến khả năng xúc tác của caspase-9. Khi bổ sung DNA2G4 ($0.4 \mu M$) vào cùng điều kiện phản ứng, RHAU23-caspase-9 chỉ mất khoảng 0.8 giờ để có thể cắt 50% lượng cơ chất, tương đương hiệu quả xúc tác khoảng $2.2 \mu M^{-1}h^{-1}$ (Hình 4B, C). Sự hiện diện DNA2G4 trong RHAU23-caspase-9 giúp cho hoạt tính tăng lên gấp 2 lần so với hoạt tính chỉ có RHAU23-caspase-9. DNA2G4 có thể đã cảm ứng sự dimer của RHAU23-caspase-9 thông qua tương tác giữa RHAU23-G4 dẫn đến tăng hoạt tính của enzyme. Phương pháp kiểm soát sự dimer cũng như hoạt tính caspase-9 bằng DNA chứa 2 cấu trúc G4 là phương pháp mới. Phương pháp này có thể ứng dụng để kiểm soát sự dimer và hoạt tính của những protein chức năng quan trọng khác trong những ứng dụng sinh hóa.



Hình 4. Phân tích hoạt tính của enzyme. A) Hoạt tính cắt caspase-9 ($0.4 \mu M$) trên cơ chất tự nhiên caspase-3 ($4 \mu M$) theo thời gian. B) Hoạt tính cắt caspase-9 ($0.4 \mu M$) + DNA2G4 ($0.4 \mu M$) trên cơ chất tự nhiên caspase-3 ($4 \mu M$) theo thời gian. C) Phần trăm sản phẩm cắt được tạo ra (%) từ caspase-9 (tròn đen) và caspase-9 + DNA2G4 (vuông đỏ) được tạo ra được phân tích bằng phần mềm AlphaEaseFC

4. Kết luận

Kiểm soát hoạt tính của caspase-9 đóng vai trò quan trọng trong quá trình giết tế bào, tiềm năng ứng dụng trong điều trị ung thư. Dung hợp caspase-9 vào peptide RHAU tạo nên protein dung hợp RHAU23-caspase-9. DNA2G4 có khả năng cảm ứng sự dimer RHAU23-caspase-9, dẫn đến tăng hoạt tính của enzyme. Đây cũng là phương pháp mới có thể ứng dụng để kiểm soát sự dimer và hoạt hóa các protein chức năng của tế bào như các protein màng hay các enzyme.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balasubramanian, S., Hurley, L. H., & Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov*, 10(4), 261-275. doi:10.1038/nrd3428
- Bao, H. L., Liu, H. S., & Xu, Y. (2019). Hybrid-type and two-tetrad antiparallel telomere DNA G-quadruplex structures in living human cells. *Nucleic Acids Res*, 47(10), 4940-4947. doi:10.1093/nar/gkz276
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*, 34(19), 5402-5415. doi:10.1093/nar/gkl655
- Chambers, V. S., Marsico, G., Boutell, J. M., Di Antonio, M., Smith, G. P., & Balasubramanian, S. (2015). High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat Biotechnol*, 33(8), 877-881. doi:10.1038/nbt.3295
- Chao, Y., Shiozaki, E. N., Srinivasula, S. M., Rigotti, D. J., Fairman, R., & Shi, Y. (2005). Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol*, 3(6), e183. doi:10.1371/journal.pbio.0030183
- Dang, D. T., Nguyen, H. D., Merckx, M., & Brunsveld, L. (2013). Supramolecular control of enzyme activity through cucurbit[8]uril-mediated dimerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(10), 2915-2919. doi:10.1002/anie.201208239
- Dang, D. T., Nguyen, L. T. A., Truong, T. T. T., Nguyen, H. D., & Phan, A. T. (2021). Construction of a G-quadruplex-specific DNA endonuclease. *Chem Commun (Camb)*, 57(37), 4568-4571. doi:10.1039/d0cc05890d
- Dang, D. T., & Phan, A. T. (2016). Development of Fluorescent Protein Probes Specific for Parallel DNA and RNA G-Quadruplexes. *Chembiochem*, 17(1), 42-45. doi:10.1002/cbic.201500503
- Dang, D. T., & Phan, A. T. (2019). Development of a ribonuclease containing a G4-specific binding motif for programmable RNA cleavage. *Sci Rep*, 9(1), 7432. doi:10.1038/s41598-019-42143-8
- Duchler, M. (2012). G-quadruplexes: targets and tools in anticancer drug design. *J Drug Target*, 20(5), 389-400. doi:10.3109/1061186X.2012.669384
- Gellert, M., Lipsett, M. N., & Davies, D. R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48(12), 2013-2018. doi:10.1073/pnas.48.12.2013

- Gyrd-Hansen, M., Farkas, T., Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Hoyer-Hansen, M., Elling, F., . . . Jaattela, M. (2006). Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol*, 26(21), 7880-7891. doi:10.1128/MCB.00716-06
- Hansel-Hertsch, R., Spiegel, J., Marsico, G., Tannahill, D., & Balasubramanian, S. (2018). Genome-wide mapping of endogenous G-quadruplex DNA structures by chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing. *Nat Protoc*, 13(3), 551-564. doi:10.1038/nprot.2017.150
- Heddi, B., Cheong, V. V., Martadinata, H., & Phan, A. T. (2015). Insights into G-quadruplex specific recognition by the DEAH-box helicase RHAU: Solution structure of a peptide-quadruplex complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(31), 9608-9613. doi:10.1073/pnas.1422605112
- Jodoin, R., Carrier, J. C., Rivard, N., Bisailon, M., & Perreault, J. P. (2019). G-quadruplex located in the 5'UTR of the BAG-1 mRNA affects both its cap-dependent and cap-independent translation through global secondary structure maintenance. *Nucleic Acids Res*, 47(19), 10247-10266. doi:10.1093/nar/gkz777
- Kuida, K. (2000). Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(2), 121-124. doi:10.1016/s1357-2725(99)00024-2
- Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2007). An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol*, 3(4), 218-221. doi:10.1038/nchembio864
- Lago, S., Nadai, M., Cernilogar, F. M., Kazerani, M., Dominiguez Moreno, H., Schotta, G., & Richter, S. N. (2021). Promoter G-quadruplexes and transcription factors cooperate to shape the cell type-specific transcriptome. *Nat Commun*, 12(1), 3885. doi:10.1038/s41467-021-24198-2
- Ma, Y., Yang, Y., Xin, J., He, L., Hu, Z., Gao, T., . . . Guo, Z. (2023). RNA G-Quadruplex within the 5'-UTR of FEN1 Regulates mRNA Stability under Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 12(2). doi:10.3390/antiox12020276
- Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., . . . Strasser, A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*, 419(6907), 634-637. doi:10.1038/nature01101
- Nguyen, L. T. A., & Dang, D. T. (2023). RHAU Peptides Specific for Parallel G-Quadruplexes: Potential Applications in Chemical Biology. *Mol Biotechnol*, 65(3), 291-299. doi:10.1007/s12033-022-00552-7
- Ou, T. M., Lu, Y. J., Tan, J. H., Huang, Z. S., Wong, K. Y., & Gu, L. Q. (2008). G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*, 3(5), 690-713. doi:10.1002/cmde.200700300
- Pan, G., O'Rourke, K., & Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*, 273(10), 5841-5845. doi:10.1074/jbc.273.10.5841
- Patel, D. J., Phan, A. T., & Kuryavyi, V. (2007). Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res*, 35(22), 7429-7455. doi:10.1093/nar/gkm711

- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., & Salvesen, G. S. (2006). The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell*, 22(2), 269-275. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.009
- Rosier, B., Markvoort, A. J., Gumi Audenis, B., Roodhuizen, J. A. L., den Hamer, A., Brunsveld, L., & de Greef, T. F. A. (2020). Proximity-induced caspase-9 activation on a DNA origami-based synthetic apoptosome. *Nat Catal*, 3(3), 295-306. doi:10.1038/s41929-019-0403-7
- Sahakyan, A. B., Murat, P., Mayer, C., & Balasubramanian, S. (2017). G-quadruplex structures within the 3' UTR of LINE-1 elements stimulate retrotransposition. *Nat Struct Mol Biol*, 24(3), 243-247. doi:10.1038/nsmb.3367
- Sen, D., & Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature*, 334(6180), 364-366. doi:10.1038/334364a0
- Wu, C. C., Lee, S., Malladi, S., Chen, M. D., Mastrandrea, N. J., Zhang, Z., & Bratton, S. B. (2016). The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun*, 7, 13565. doi:10.1038/ncomms13565
- Yin, Q., Park, H. H., Chung, J. Y., Lin, S. C., Lo, Y. C., da Graca, L. S., . . . Wu, H. (2006). Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell*, 22(2), 259-268. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.030

**ENHANCEMENT OF CASPASE-9 ENZYME ACTIVITY
BY USING DNA BEARING 2 G-QUADRUPLEXES**

Dang Thanh Dung

Ho Chi Minh City Open University, Vietnam

Corresponding author: Dang Thanh Dung – Email: dung.dthanh@ou.edu.vn

Received: April 14, 2023; Revised: May 10, 2023; Accepted: May 17, 2023

ABSTRACT

*Caspase-9 plays an important role in the apoptosis pathway. In cells, caspase-9 exists in the inactive monomeric state and becomes active in the dimer state. Therefore, controlling the dimerization of caspase-9 can control the caspase-9 activity. In this study, caspase-9 was activated by a DNA sequence containing two G-quadruplex structures (DNA2G4). Caspase-9 was fused with the RHAU peptide by molecular biology techniques to form the recombinant protein RHAU23-caspase-9. RHAU23-caspase-9 was expressed in *E. coli* under IPTG induction and purified by affinity chromatography with His column. DNA2G4 was able to induce dimerization of RHAU23-caspase-9 through a specific interaction between RHAU and G4, leading to stimulation of enzyme activity. Activation of RHAU23-caspase-9 by DNA2G4 increased enzyme activity about 2.0 times that of RHAU23-caspase-9. Controlled caspase-9 activity has the potential to inhibit the growth of cancer cells.*

Keywords: activation; dimer; DNA2G4; Enzyme; RHAU23-caspase-9