α -螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装

左利民^①, 康艳晶^①, 罗施中^{①②*}

① 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029;

② 清华大学生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084

* 联系人, E-mail: luosz@mail.buct.edu.cn; luoshizhong@tsinghua.org.cn

2009-10-04 收稿, 2010-03-10 接受

国家自然科学基金(20932003)、教育部留学回国人员科研启动经费和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目

摘要 膜蛋白参与细胞中的各项生命活动, 具有复杂而特殊的生理功能, 同时它也是重要的药物靶, 因此研究膜蛋白的结构及功能对于保持人类健康和治疗疾病具有重要的意义. α -螺旋跨膜蛋白是生物体内最为重要和广泛的一类膜蛋白, 本文综述了 α -螺旋跨膜蛋白在折叠和自组装特性上的最新研究进展, 总结了跨膜过程中的两阶段模型; 详细介绍了 α -螺旋跨膜蛋白的跨膜性质及其跨膜的影响因素, 包括跨膜序列的长度和疏水性、疏水性错配和界面锚固、极性残基和脯氨酸等; 进一步总结了 α -螺旋跨膜蛋白通过跨膜螺旋相互作用形成高度有序自组装体的结构基础; 并介绍了研究 α -螺旋跨膜蛋白折叠和自组装常用的化学和生物学方法, 希望能为进一步开展该领域研究提供参考.

关键词

α -螺旋跨膜蛋白
折叠
自组装
两阶段模型

蛋白质是生命的物质基础, 是生物体的重要组成部分和各项生理活动的实现载体, 其中 1/4~1/3 是位于细胞膜上的膜蛋白^[1,2]. 这些膜蛋白参与细胞中的各项生命活动, 具有许多复杂而特殊的生理功能, 例如, 参与细胞内外物质交换、细胞识别与免疫应答、信号传导和调控以及能量传递等. 同时它也是重要的药物靶, 在已知的和正在研究的药物靶标中大约有 70% 是膜蛋白^[3]. 因此对于膜蛋白结构及其功能的研究是当前化学和生物学的一个前沿和热点领域. 蛋白质折叠过程的研究对于理解蛋白质结构与功能的关系意义非凡, 在过去的几十年中, 水溶性蛋白折叠的热力学和动力学已经得到广泛的研究. 相对而言, 对膜蛋白折叠和自组装的研究还只处于起步阶段. 首先由于膜蛋白的过表达可能对表达宿主产生毒害作用, 并且很难选择合适的表面活性剂将其从生物膜中溶解出来, 从而限制了膜蛋白的过量表达和纯化; 而且膜蛋白的稳定性和功能受特殊的两亲性环境的影响; 同时由于生物膜磷脂双分子层的化学复杂性, 使从理论和实验方面来确定膜蛋白

折叠和自组装的决定因素都相当困难; 上述膜蛋白研究过程中存在的问题都严重阻碍了膜蛋白在生物学和化学上的研究进展. 因此与水溶性蛋白相比, 已经鉴定结构的膜蛋白只占很小的一部分, 大约在已知的大约 56000 种蛋白质结构数据库 Protein Data Bank (PDB) 中, 只有 1%~2% 蛋白质的结构是膜蛋白结构^[4]. 近年来在结构生物学、细胞生物学、生物化学和生物物理学等多学科交叉的基础上, 尤其是化学和生物学中新的分析方法的产生, 促使膜蛋白折叠领域的研究开始取得一些进展, 新的膜蛋白结构也逐渐得以确定^[5~7].

由于跨膜蛋白具有跨越细胞膜磷脂双分子层的特性, 能够穿透生物膜渗透性屏障, 因此在许多重要的细胞生理过程中发挥着关键的作用, 包括信号和能量转换, 主动运输, 离子流动以及神经传导等. 例如整合素(Integrin)在凝血过程以及血栓形成过程中起着非常重要的作用, 通过对其溶液结构的研究表明整合素跨膜区的异源二聚响应细胞内外环境的变化, 实现跨膜信号的传递, 从而激活或者抑制整合素

英文引用格式: Zuo L M, Kang Y J, Luo S Z. Folding and self-assembly of α -helix transmembrane protein (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 1426—1437, doi: 10.1360/972009-2573

的活性^[8,9];清华大学施一公研究小组最近解析的甲酸运输跨膜蛋白晶体结构显示甲酸运输跨膜蛋白由6个跨膜区单体形成的五聚体组成,其中位于五聚体跨膜区中心的氨基酸残基对于甲酸的跨膜运输起着非常重要的调节作用^[10];1998年,MacKinnon研究小组解析出了链霉菌的离子通道蛋白质KcsA的高解析三维结构影像,并首度从原子层次去了解离子通道的作用方式,因此也获得了2003年诺贝尔化学奖,根据KcsA的立体结构,对于通过离子的选择性主要由组成离子通道的跨膜区的氨基酸残基特异选择性所决定,同时离子通道的开启也与跨膜区的排列相关,当离子通道接收到特定的讯号,离子通道跨膜区发生重排,蛋白质结构便会发生改变,因此造成闸门的开关^[11];对在神经传递中起着非常重要作用的G蛋白偶联受体(GPCR)晶体结构的研究显示GPCR通过7个跨膜区的自我组装形成一个高度有序的跨膜结构域,在配体结合到GPCR的胞外区,然后通过其7个跨膜区的重排作用传递跨膜信号,从而影响和细胞内的相关G蛋白的结合,进一步产生细胞内相应下游信号的传递^[12]。尽管跨膜蛋白在生物体内具有非常重要的生理功能,但由于跨膜区的高度疏水性,跨膜蛋白容易自聚产生沉淀,人们对于跨膜蛋白的研究仍主要集中在其胞外和胞内部分。近年来,随着新的化学和生物学方法的建立,人们已经逐步开展了跨膜蛋白的折叠和自组装性质研究,同时跨膜区对细胞调节的重要性已逐渐显现出来,例如Degrado研究小组运用计算机模拟设计出一类新型外源跨膜肽,并测试其对跨膜靶序列的识别以及调节细胞作用的研究^[13]。跨膜蛋白根据跨膜区结构的不同主要分为两类^[14]:一类是跨膜区主要由 α -螺旋组成的跨膜蛋白(称为 α -螺旋跨膜蛋白),另一类是跨膜区主要由 β -折叠组装成桶状的跨膜蛋白(称为 β -桶状跨膜蛋白)。已有研究表明,生物体内的跨膜蛋白主要以 α -螺旋跨膜蛋白的形式存在^[2],比如细胞表面受体、离子通道、载体等。 α -螺旋跨膜蛋白的跨膜螺旋嵌入在一个被水溶液包围的具有亲水头部、疏水尾部且中央为疏水核心的20 Å厚的磷脂双分子层中^[15],在各向异性和化学不均一环境中展现出了和水溶性蛋白截然不同的折叠和自组装特性。本文主要介绍了 α -螺旋跨膜蛋白在折叠和自组装特性上的最新研究进展,总结了 α -螺旋跨膜蛋白跨膜的两阶段模型和跨膜性质,及其跨膜螺旋之间相互作用的结构基础,旨在为

进一步开展该领域研究提供参考。

1 α -螺旋跨膜蛋白折叠研究

研究蛋白的折叠过程需要首先了解伸展状态下蛋白的二级结构,由于 α -螺旋跨膜蛋白与水溶性蛋白伸展状态所处的环境有着显著的差异,从而导致了两者伸展状态下的结构差异。在水溶液环境中,水溶性蛋白的伸展状态没有特定的二级结构,主要以无规卷曲为主,而处于磷脂双分子层环境中的 α -螺旋跨膜蛋白则不同,其伸展状态保持着足够的螺旋趋势,因此对于 α -螺旋跨膜蛋白的折叠研究需要新的理论支持。

1.1 α -螺旋跨膜蛋白折叠简化模型——两阶段模型

1990年,基于细菌光合作用中心——噬菌调理素(Bacteriorhodopsin)跨膜蛋白结构解析的基础^[16-21],Popot和Engelman提出了 α -螺旋跨膜蛋白折叠的“两阶段模型”理论^[22]。第一个阶段, α -螺旋跨膜蛋白首先形成 α 螺旋并插入到磷脂双分子层中,驱动力来自于疏水侧链从水相转移到磷脂双分子层的迁移能(图1(a))。在随后的第二个阶段,也是关键的一步,这些 α -螺旋跨膜蛋白通过跨膜区在磷脂双分子层中的相互作用,形成高度有序的自组装体(图1(b))。

Popot和Engelman同时也从热力学角度通过自由能估算对 α -螺旋跨膜蛋白在磷脂双分子层中倾向于形成 α -螺旋做出了解释^[22]。如图1所示,在水溶液中 α -螺旋跨膜蛋白从 α -螺旋变化到无规卷曲,氢键的数目并未发生很大的变化,故可以认为其在水溶液中 α -螺旋和无规卷曲两种状态之间的转换是没有能量变化的,即 $\Delta G \approx 0$;而 α -螺旋跨膜蛋白在磷脂双分子层中由于受到疏水作用的影响更有利于形成疏水 α -螺旋结构,将疏水 α -螺旋转移到水溶液中将大大减小熵值,即在磷脂双分子层中的 α -螺旋比水中的 α -螺旋稳定,其自由能变化约30 kcal/mol,即 $\Delta G \approx 30$ kcal/mol;无规卷曲状态的 α -螺旋跨膜蛋白从水溶液转移到磷脂双分子层,由于失去了蛋白与水之间形成的氢键作用,其自由能变化约为40 kcal/mol,即 $\Delta G \approx 40$ kcal/mol;根据图1所示的热力学平衡,计算得知 α -螺旋跨膜蛋白在磷脂双分子层中从 α -螺旋变化到无规卷曲的自由能变化为70 kcal/mol。Popot和Engelman根据他们提出的两阶段模型认为 α -螺旋跨膜蛋白在形成跨膜 α -螺旋时会出现3

图1 Popot 和 Engelman 提出的关于 α -螺旋跨膜蛋白折叠的两阶段模型^[22]

- (a) 第一阶段, α -螺旋跨膜蛋白在磷脂双分子层中形成稳定的 α -螺旋;
(b) 第二阶段, α -螺旋跨膜蛋白通过自身 α -螺旋之间的相互作用形成高度有序的自组装体

种可能: 跨膜 α -螺旋可能离开磷脂双分子层成为在水相中的 α -螺旋; 或者它可能在磷脂双分子层中形成无规卷曲; 或者跨膜 α -螺旋可能与其他跨膜 α -螺旋通过氢键、电荷和范德华力等相互作用形成高度有序的自组装体。前面的自由能估算证明第一、二种情况违背了热力学原理, 因此, α -螺旋跨膜蛋白既不能离开磷脂双分子层进入水相, 也不能在磷脂双分子层内展开, 只能形成 α -螺旋或者相互作用的 α -螺旋自组装体。

1.2 两阶段模型的应用和局限性

两阶段模型作为一个简洁有效的研究模型, 对于在一定程度上解释 α -螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装具有非常重要的意义^[23]。两阶段模型刻意忽略了一些复杂性研究, 只是探究跨膜蛋白如何有效地插入到膜中形成高度有序的自组装体而忽略了其他潜在的状态, 故称得上是一个有效的简化模型。两阶段模型研究的重点集中在跨膜氨基酸序列的长度、组成和排列顺序, 以及脂双层的组成对于 α -螺旋跨膜蛋白的折叠以及相互作用的影响。最近采用两阶段模型研究的结果表明, 跨膜区中特定的氨基酸序列决定了 α -螺旋跨膜蛋白折叠和螺旋间相互作用的热力

学平衡, 两阶段模型研究从分子水平上解释了 α -螺旋跨膜蛋白的各种生物进程, 为进一步研究其结构与功能的关系提供了理论的基础和切实可行的方法^[14,24]。

α -螺旋跨膜蛋白从可溶性状态到跨膜状态的变换, 并不是简单地直接插入到膜的磷脂双分子层中, 而是通过膜界面并可能采取不同的构象进入到磷脂双分子层。无论是伴随着折叠过程中的过渡态还是在特定实验条件下可以被分离的中间体, 对于跨膜螺旋的不同构象研究仅采用两阶段模型来进行解释显然是不够的。1999年 White 和 Wimley 进一步完善了“两阶段模型”^[25], 其建立的模型认为在磷脂双分子层和水溶液之间还存在一个水相和膜的界面, 同样将热力学平衡循环运用到模型的各个步骤, 包括 α -螺旋跨膜蛋白在水相和膜界面上折叠和展开, 形成 α -螺旋插入膜中, 并通过相互作用形成自组装体, 进而采用步步为营(boot-strapping)的方法计算和分析实验中得到的热力学数据, 量化影响膜/水界面 α -螺旋跨膜蛋白构象的因素。但是该模型也存在着实验步骤繁琐、计算数据复杂等缺点, 因此在 α -螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装领域仍然主要采用“二阶段模型”理论。

2 α -螺旋跨膜蛋白跨膜性质研究

人们对水溶性蛋白的折叠研究工作已经取得了长足的进展, 积累了大量关于特定水溶性蛋白热力学平衡和折叠自由能的研究数据和研究方法。但是蛋白质折叠研究的目标并不是研究某些特定蛋白的热力学和动力学数据, 而是在总结大量蛋白的研究数据基础上, 归纳出适用于一般蛋白的普遍规律, 最终达到能够通过已知氨基酸序列来预测蛋白质结构的目的。随着基因组序列的日益实用化和拓扑学原理在实验中应用的普遍化^[26,27], 使测定相应的 α -螺旋跨膜蛋白跨膜序列日益清晰起来^[28], 在因特网上有许多免费预测 α -螺旋跨膜蛋白跨膜区域的网站, 其中 <http://www.sacs.ucsf.edu/Links/transmem.html> 上列举了已经存在的关于跨膜区预测的大部分网站, 包括“DAS”^[29], “TMHMM”^[30]等。有效的拓扑学数据和大量的膜蛋白晶体衍射结构提供的序列信息可以建立一个精确的算法来预测跨膜域的存在位置及其间的相互作用, 这均为 α -螺旋跨膜蛋白跨膜性质的研究带来了极大的便利。但是影响 α -螺旋跨膜蛋白

跨膜性质的决定因素又有哪些呢? 人们根据已经得到的实验结果给出的答案是: 序列的长度和疏水性、疏水性错配和界面锚固、极性残基和脯氨酸等^[23]。

2.1 跨膜区氨基酸序列长度和疏水性的影响

对原核和真核系统中 α -螺旋跨膜蛋白的研究表明, 疏水性强的氨基酸序列, 即使相当短也可以形成跨膜区, 例如在微粒体中9个亮氨酸已经足够形成跨膜区^[31], 而在大肠杆菌中也仅要11个亮氨酸就可以形成跨膜区^[32]。另一方面, 虽然疏水性氨基酸序列长度可以延伸到40甚至50个, 其形成的跨膜区可能也只有一个。如果 α -螺旋跨膜蛋白含有疏水性氨基酸序列连续长度长于26个氨基酸残基, 其形成的跨膜区就可能会发生扭曲或弯曲^[33]。而对于跨膜区长度一定的 α -螺旋跨膜蛋白, 跨膜区内氨基酸残基疏水性的强弱决定了跨膜区的跨膜与否。傅里叶红外光谱(FT-IR)研究结果表明跨膜肽 Lys₂-Leu₂₄-Lys₂ 能够非常容易跨越磷脂酰胆碱膜, 而且由于这一过程在热力学上是熵增加的过程, 因此跨膜肽一旦跨越磷脂酰胆碱膜, 就能够形成稳定的跨膜 α -螺旋, 从而导致其两端氨基酸残基的酰胺质子也不能互相交换; 与之相反, 跨膜肽 Lys₂-Ala₂₄-Lys₂ 处于能够形成稳定跨膜 α -螺旋所需最低疏水性的临界点上, Lys₂-Ala₂₄-Lys₂ 可以形成跨膜 α -螺旋插入到磷脂酰胆碱膜中, 跨膜肽逐渐转向膜表面和水相中, 从而导致所有的酰胺质子在膜内迅速地发生交换^[34-36]。采用固态核磁共振对¹⁵N标记丙氨酸残基的研究显示^[37], 跨膜肽 Lys₃-Ala₁₄-Leu₄-Lys₃ 和 Lys₃-Ala₁₆-Leu₂-Lys₃ 可以稳定地插入膜中, 而 Lys₃-Ala₁₈-Lys₃ 和 Lys₃-Ala₁₇-Leu-Lys₃ 最初主要形成跨膜结构, 但一段时间后它们跨膜结构的核磁共振信号逐渐减弱, 表明跨膜结构的逐渐转化。因此, α -螺旋跨膜蛋白跨膜性质取决于跨膜区氨基酸残基序列的组成和长度是否与磷脂双分子层膜的疏水性和厚度一致。

2.2 跨膜区两端序列的影响

跨膜区两端的氨基酸序列可以通过与水相和磷脂双分子层界面的相互作用, 从而调节 α -螺旋跨膜蛋白的跨膜性质。在不同 pH 条件下, 由于跨膜区两端氨基酸残基的离子化状态不同, 从而能够诱导或阻止跨膜 α -螺旋之间的相互作用: 如果多聚亮氨酸残基组成的跨膜肽以 Lys-Asp₃ 或 Lys-Asp 为两端的

氨基酸序列, 在低 pH 值条件下, 跨膜肽在脂质 1,2-diioleoyl-sn-glycero-3-phocholine(DOPC)中由于静电排斥作用会阻止自身跨膜螺旋之间的相互作用, 而以 Lys₂ 为两端的氨基酸序列在中性 pH 值条件下就可以破坏跨膜肽的二聚相互作用^[38]。中性 pH 条件下, 以 Lys-Asp₃ 为两端的跨膜肽和以 Lys₂ 为两端的跨膜区肽在 DOPC 中能够相互作用形成异源二聚体, 表明跨膜肽两端氨基酸残基之间的静电相互作用也可以诱导跨膜螺旋的相互作用。通过分析和比对发现 α -螺旋跨膜蛋白位于细胞膜内侧的氨基酸序列主要由碱性氨基酸组成, 例如精氨酸和赖氨酸等, 其原因可能与 α -螺旋跨膜蛋白的转运过程相关^[39], 这也说明跨膜区两端的氨基酸序列对于其在膜双层中的正确跨越方向起着非常重要的作用。同时 α -螺旋跨膜蛋白在膜水界面上存在的氨基酸残基主要由色氨酸和酪氨酸组成, 已有研究表明色氨酸和酪氨酸的芳香基团可能对于跨膜区的跨膜过程起着锚固作用^[40]。

2.3 跨膜区极性氨基酸残基的影响

α -螺旋跨膜蛋白的跨膜与否取决于整个跨膜序列的疏水性强弱。在跨膜序列中突变或者引入一个极性氨基酸将大大降低整个跨膜序列的疏水性, 但如果其他的氨基酸残基保持足够的疏水性, 那么该跨膜序列仍然是一个稳定的跨膜螺旋。London 研究小组研究发现在 DOPC 膜中, 多聚亮氨酸组成的跨膜序列中的疏水核心——亮氨酸被极性氨基酸取代, 如丝氨酸, 天冬酰胺, 赖氨酸, 天门冬氨酸等, 其仍然能够实现跨膜, 尽管这些离子化的极性氨基酸残基在特定 pH 下可诱导其跨膜方向及其相互作用的变化^[41]。

2.4 跨膜区脯氨酸残基的影响

脯氨酸是一个结构比较特殊的氨基酸, 酰胺骨架和侧链基团连接在五元环的吡咯烷上, 从而赋予脯氨酸特殊的刚性构象性质。在水溶液中脯氨酸缺乏能与螺旋 i-4 位置的羰基形成氢键的酰胺质子并且影响其前一位氨基酸残基的扭转角, 从而主要以伸展的构象存在, 因此在水溶性蛋白中脯氨酸被认为是螺旋结构的破坏者。而对于 α -螺旋跨膜蛋白, 跨膜 α -螺旋中脯氨酸的作用是微妙的。Deber 研究小组在研究胰岛素受体(Insulin Receptor)的跨膜 α -螺旋中发现, 将跨膜序列 Gly-Pro 突变为 Ala-Ala, 其在表面活性剂中更倾向于形成 α -螺旋结构, 并且热变实

验中的变性温度变高,说明了突变体增强了跨膜 α -螺旋的自身相互作用^[42].但是将Ike外壳蛋白中(Ike Coat Protein)的一个脯氨酸突变为甘氨酸将大大降低其自身的螺旋结构,并且在较高温度下主要以 β -折叠的结构存在^[43].通过圆二色谱测定一系列疏水性多肽,表明脯氨酸支持 α -螺旋的形成^[44].同时在跨膜序列较长的跨膜 α -螺旋中一个单一的脯氨酸可以使其形成发夹式螺旋从而形成两次跨膜^[33].一系列数据表明,在跨膜 α -螺旋中插入一个脯氨酸阻止或者增强自身 α -螺旋结构,主要取决于整个跨膜区序列或者脂双层环境^[42~44].

2.5 疏水性不匹配的影响

除了 α -螺旋跨膜蛋白的跨膜区序列会影响其自身的跨膜性质,磷脂双分子层中脂肪链的长度与跨膜区之间的疏水性是否匹配也能够影响它的跨膜性质.London 研究小组通过检测跨膜序列中色氨酸的荧光变化探讨一系列的由亮氨酸和丙氨酸组成的模型跨膜肽的疏水性不匹配问题^[45,46].他们的研究表明,使用不同长度的脂酰基能够使跨膜肽处于膜表面和跨膜状态之间的变换,也就是说跨膜肽跨膜的自由能变化可通过疏水性错配和胆固醇的含量进行调节.Killian 的研究小组在脂质混合物或纯脂质人工膜环境中采用一系列交替的亮氨酸-丙氨酸模型跨膜肽进行疏水不匹配研究,正面或负面的不匹配都会减少跨膜肽跨越磷脂双分子层的程度,从而导致过剩的跨膜肽形成聚集体^[47,48].因此,疏水性不匹配可能影响 α -螺旋跨膜蛋白构象、折叠和聚集状态.

3 螺旋-螺旋相互作用的测定方法

随着新的蛋白表达载体和偶合方法的建立^[49],人们可以通过大肠杆菌蛋白表达体系或者固相合成的方法得到毫克级的 α -螺旋跨膜蛋白,从而为研究其自组装过程的分子机制提供足够的原料^[5,6,50,51].人们已经发展了一系列化学和生物学方法用于研究螺旋-螺旋相互作用,以下5种方法是最为常用的测定方法.

3.1 SDS-PAGE

十二烷基硫酸钠(SDS)一般来说是水溶性蛋白的变性剂,从而SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)广泛应用于变性电泳测定蛋白质的表观分子量;同时SDS又是一种阴离子表面活性剂,在水溶液中能

够形成胶束,从而稳定 α -螺旋跨膜蛋白,因此SDS-PAGE也是一种常用于检验跨膜螺旋之间相互作用的简便方法^[52,53].如果 α -螺旋跨膜蛋白在SDS-PAGE中的表观分子量等于自身分子量的两倍或者以上,通常可以认为其通过自身跨膜螺旋相互作用,形成二聚或者多聚的自组装体.同时由于SDS是一种非常强的表面活性剂,能够破坏大部分的弱相互作用,例如电荷、极性等,这样那些弱二聚体的跨膜蛋白,在SDS-PAGE实验中表现为单体的形式.因此SDS-PAGE主要应用在含有强跨膜螺旋相互作用的 α -螺旋跨膜蛋白二聚研究,比如在研究血型糖蛋白A(Glycophorin A, GpA)的二聚过程中,能够在SDS-PAGE上清楚地看到单体和二聚体条带同时存在,说明在SDS表面活性剂中,GpA位于单体和二聚体的平衡状态.本研究小组采用SDS-PAGE研究了血小板表面膜糖蛋白(Glycoprotein Ib β , GP Ib β)跨膜肽的多聚情况^[54]:随着上样浓度的增加,在SDS-PAGE不仅能够看到二聚体的形成,同时还出现了四聚体等多聚体的形式.相对于SDS,全氟辛酸钠(sodium perfluorooctanoate, PFO)是一种弱的表面活性剂,并且研究表明PFO能够维持跨膜螺旋之间的弱相互作用,因此PFO-PAGE也成为一种用于检验跨膜螺旋之间相互作用的快捷有效的方法^[55~57].

3.2 荧光共振能量转移(FRET)

荧光共振能量转移(FRET)的原理就是供体和受体之间达到合适的距离(小于 R_0)时,以供体的激发光激发,处于激发态的供体分子可通过偶极-偶极的相互作用传递至受体分子,而后受体分子通过发射出光子而松弛.FRET的表现特性就是供体的荧光强度比它单独存在时要低得多,而受体发射的荧光却大大增强,因此根据这一特性,FRET可对分子间的相互作用进行原位、实时、定量的检测^[58~60].Fisher研究小组首先将FRET应用于表面活性剂中跨膜螺旋相互作用的热力学研究^[61].Kiria研究小组进一步将FRET扩展到脂质体(与完整的细胞膜更为类似的模拟膜环境)中跨膜螺旋相互作用的热力学研究,而且不仅仅局限于同源二聚,还包括异源二聚^[62~64].我们研究小组首次将FRET方法应用到不同跨膜螺旋之间相互作用的热力学研究,包含膜糖蛋白复合物(Glycoprotein Ib-IX, GP Ib-IX)中3个不同跨膜肽形成的异源四聚体的研究^[54].如图2所示,通过利用跨

膜区附近天然存在的半胱氨酸形成二硫键, 我们首先将异源四聚体转换为异源二聚体, 进而用 Cy3 和 Cy5(美国 Invitrogen 公司)对其进行荧光标记, 采用 FRET 观测到供体和受体标记的跨膜肽之间能量的转移说明跨膜肽存在着跨膜螺旋之间的相互作用, 形成异源四聚体.

3.3 二硫键交换(thiol-disulfide exchange)

二硫键交换已经被广泛地应用于水溶性蛋白质折叠、稳定性和相互作用的定性和定量研究^[65]. De-grado 研究小组首先将二硫键交换应用于检测跨膜螺旋在表面活性剂或者脂质体中的相互作用^[66,67]. 二硫键交换原理是将包含有半胱氨酸残基的跨膜肽或蛋白置于能够迅速进行二硫键可逆酯交换的环境中, 一般采用大大过量的 GSH/GSSG 氧化还原体系, 从而导致二硫键的形成主要取决于跨膜区之间的相互作用. 通过高效液相色谱定量分析, 二硫键连接的二聚体产物的多少也就标志着跨膜区相互作用的强弱程度. 如图3所示膜糖蛋白 GP Ib β 的跨膜肽在二硫键交换实验中主要以二聚体的形式存在, 说明 GP Ib β 的跨膜螺旋之间存在着比较强的跨膜螺旋相互作用^[68], 这和我们采用其他方法如 SDS-PAGE 以及后面要讲述的 TOXCAT 的结果非常一致^[54].

3.4 分析超速离心

分析超速离心方法可以直接用于测量溶液中蛋白和多肽的表观分子量, 从而广泛地应用于研究水溶性蛋白的聚集状态. 随着仪器的发展(比如 Beckman-Coulter 仪器公司的两款分析超速离心仪器, XLA 和 XLI)和新型数据处理软件的应用, 采用沉降速率和沉降平衡分析, 分析超速离心不仅能够区分蛋白不同的聚集状态(包括自聚和异聚), 而且能够计算自聚的化学反应常数和自由能^[69,70]. 相对于水溶性蛋白, 跨膜蛋白必须溶解在含有表面活性剂或者被脂质体包裹的溶液中, 因此在分析超速离心中测定的表观质量是跨膜蛋白和结合的表面活性剂的质量总和. 1976 年 Tanford 和 Reynolds 发展了一种非常有创造性的方法从蛋白-表面活性剂复合物中直接测定目标蛋白的摩尔质量^[71]. 他们通过采用一定比例的 H₂O:D₂O 溶剂混合物, 在超速离心过程能够恰好密度匹配蛋白-表面活性剂复合物中的表面活性剂, 直接得到跨膜蛋白的表观摩尔质量. 最近也发展采用

图2 采用 FRET 方法对膜糖蛋白复合物 GP Ib-IX 跨膜肽之间相互作用的研究^[54]

图3 膜糖蛋白 GP Ib β 跨膜肽的二硫键交换反应^[68]

GSH 为还原型谷胱甘肽; GSSG 为氧化型谷胱甘肽

葡萄糖、甘油等进行密度匹配, 应用于膜蛋白聚集状态的研究^[70].

3.5 TOXCAT

前面采用的方法都是在细胞膜的模拟环境比如表面活性剂或者脂质体中进行跨膜螺旋相互作用的研究, 但是在真实的细胞膜环境中跨膜螺旋是否有相互作用呢? 因此有必要发展一个全新的生物学方法研究真实细胞膜中跨膜蛋白的相互作用. ToxR 分析体系首先由 Langosch 研究小组开发出来测量大肠杆菌内膜中跨膜螺旋之间的相互作用^[72]. 这种方法的原理是: ToxR 是一个跨膜的转录活化因子, 它的二聚能够使大肠杆菌中的 ctx 启动子的活性提高 100 倍; 同时设计一个融合蛋白包括 ToxR 的 N 端, C 端外周胞质蛋白——麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP), 在连接 N 端和 C 端的跨膜区插入自己感兴趣的跨膜序列. 如果跨膜螺旋存在着相互作用, 从而导致 ToxR 的二聚, 最终激活 ctx 启动子连接的

报告基因 β -半乳糖苷酶,因此通过检测 β -半乳糖苷酶活性的强弱,我们能够知道跨膜螺旋相互作用的强弱. Russ 和 Engelman 将上述方法进一步发展为 TOXCAT(图 4),报告基因采用氯霉素乙酰转移酶(CAT)取代 β -半乳糖苷酶,能够得到更好的检测活性^[73].

Shai 研究小组将 TOXCAT 方法进一步改进适用于异源二聚的研究^[74,75],他们通过在 TOXCAT 的大肠杆菌膜上直接引入跨膜肽,从而检测跨膜肽对于 CAT 活性的抑制作用,可以得出异源二聚的强弱,其中最大抑制率基本上可以达到 50%. 同时更为直观地检测异源二聚的 TOXCAT 改进方法——GALLEX 方法^[76]可以通过检测报告基因 β -半乳糖苷酶活性的强弱直接对应异源二聚的强弱.

4 α -螺旋跨膜蛋白自组装——跨膜螺旋之间相互作用

根据两阶段模型理论,稳定的 α -螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装可以在概念上分为两个步骤:形成独立稳定的跨膜螺旋以及跨膜螺旋相互作用形成自组装体.因此 α -螺旋跨膜蛋白的自组装可以定义为在特定的表面活性剂存在的条件下其通过跨膜螺旋相互作用形成高度有序自组装体的过程,其包含有不同跨膜蛋白相互作用的异源自组装和相同跨膜蛋白相互作用的同源自组装两种形式. α -螺旋跨膜蛋白的自组装对于其生理功能的实现起着非常重要的作用,比如对 G 蛋白偶联受体(GPCR)的功能研究显示 GPCR 在细胞膜上首先通过 7 个跨膜区的相互作用自

组装形成 GPCR 单体,然后通过单体之间的跨膜螺旋相互作用进一步自组装形成同源二聚体,从而实现跨膜信号的传导^[77,78].而对于含有多个跨膜区的跨膜蛋白,由于跨膜区之间的连接区域以及膜内的配体对于 α -螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装上有一些影响,因此具有单一跨膜 α -螺旋的跨膜蛋白最适用于两阶段模型.研究发现跨膜螺旋间主要通过 GXXXG,极性残基,以及亮氨酸拉链区相互作用形成高度有序自组装体^[79].

4.1 GXXXG 序列(GXXXG Motif)

GXXXG 序列作用模式(两个甘氨酸残基或者小位阻氨基酸残基被任意 3 个残基分隔开)在跨膜螺旋相互作用方面起着重要作用^[79].耶鲁大学的 Engelman 研究小组(<http://engelmann.csb.yale.edu/index.html>)首先确定了 GXXXG 序列作用模式,这个序列对应 GpA 跨膜区中两个关键甘氨酸残基(Gly⁷⁹ 和 Gly⁸³),其中 X 代表任意氨基酸残基,并且甘氨酸残基以及间距的重要性已通过基因突变方法确定^[80,81],同时在大肠杆菌内膜上使用 TOXCAT 方法也得以确认^[73].同时 GpA 跨膜区中的其他氨基酸残基也参与了二聚的相互作用,通过基因突变的方法得到 GpA 跨膜区最终的二聚保守序列为 L⁷⁵IXXGVXXGVVXT⁸⁷. GpA 跨膜肽的 NMR 结构分析中发现由 GXXXG 序列组成的凹槽结构和邻近的缬氨酸残基组成的凸起结构共同形成了有助于二聚体形成的接合界面^[82-84].中心轴的右手螺旋转动部分由于受到跨膜区边界区的 Leu⁷⁵, Ile⁷⁶ 和 Thr⁸⁷ 残基的横向作用力而趋于平滑^[84]. Bcl-2 超家族的促凋亡成员 BNIP3 是具有单一跨膜 α -螺旋的跨膜蛋白,通过 TOXCAT 和 SDS-PAGE 证实其在生物膜和不同表面活性剂中支持特异性序列 GXXXG 的二聚相互作用.在保守的跨膜区序列 AXXXGXXXG 中甘氨酸或者丙氨酸残基的突变将破坏二聚相互作用^[85].在细胞相互作用中起着非常重要作用的整合素 α_{IIb} 亚基(Integrin α_{IIb})的跨膜区中也包含 GXXXG 序列,并且通过 SDS-PAGE、分析超速离心和 TOXCAT 等方法确认其跨膜区二聚作用的保守序列是 VGXXGGXXXL^[52].

另一方面,并非所有 GXXXG 序列都促进跨膜区二聚相互作用^[86].例如,尽管癌基因 Colon Carcinoma Kinase 4 (CCK4)跨膜区中包含有 GXXXG 序列模式,但是分析超速离心结果显示包含其跨膜区的

图 4 研究大肠杆菌内膜上跨膜螺旋相互作用的 TOXCAT 方法

Ctx 启动子经过细胞质中 N 末端的 ToxR(■)的二聚而活化 CAT, 从而导致细胞质中的 ToxR'(◆)产生聚集. 外周胞质 C 末端的 MBP 区域(●)锚固在膜内, ToxR' 是 ToxR 在细胞内的 DNA 结合区域^[73]

融合蛋白在表面活性剂中并没有自聚现象^[87]. TOX-CAT 研究还表明, 大肠杆菌细胞内膜上的一种酪氨酸激酶受体(discoidin domain receptor 1, DDR1)的跨膜区能够产生二聚, 但是其中包含的 GXXXA 序列并不是其产生二聚的关键因素^[88].

4.2 极性残基

在高度疏水环境的磷脂双分子层的跨膜区序列中插入亲水性的极性残基, 不但会大大影响跨膜蛋白的跨膜性质(本文 2.3 节), 同时还会影响跨膜螺旋之间的相互作用. 实验表明跨膜区中引入的天冬酰胺残基可以促进跨膜螺旋的相互作用^[89-91]. DeGrado 研究小组发现包含一个天冬酰胺的跨膜区模型多肽在 SDS 表面活性剂中自组装形成三聚体, 同时分析超速离心和 FRET 实验表明, 在其他非离子型或两性离子洗涤剂中, 其也以三聚体的形式存在; 如果将其中的天冬酰胺突变为缬氨酸, 跨膜肽主要形成单聚体, 这也说明了极性氨基酸天冬酰胺在跨膜区的自组装中起着非常关键的作用. Engelman 研究小组采用 SDS-PAGE 实验发现将跨膜区中的氨基酸残基突变为天冬酰胺将会大大增强融合蛋白的二聚作用, 并且在 TOXCAT 实验中得到了进一步的证实. 通过 NMR 技术对跨膜区模型多肽进行分子水平上的结构解析, 发现天冬酰胺侧链酰胺上的氢质子能够和自身的羰基之间形成不对称的氢键相互作用, 从而促进了跨膜肽的自聚(二聚或者三聚)^[90].

本研究小组研究的膜糖蛋白复合物 GP Ib β 跨膜区在 SDS-PAGE 和 TOXCAT 中能够产生自聚作用, 而跨膜区中的极性氨基酸 Q¹²⁹ 和 H¹³⁹ 对于其自聚作用起着非常重要的作用. 当我们将极性氨基酸 Q¹²⁹ 或者 H¹³⁹ 突变为 L, 将大大降低 GP Ib β 跨膜区的自聚作用. BNIP3 跨膜区在细胞膜和表面活性剂中形成紧密的二聚体, 极性残基 His¹⁷³ 对这种相互作用是至关重要的^[85].

4.3 亮氨酸拉链区(leucine zipper motif)

如图 5 所示, 组成跨膜螺旋的氨基酸序列根据其 α -螺旋构象特征可以分成具有 7 个位点的重复区域(abcdefg)_n, 称为七肽重复区(heptad repeat), 如果在这段肽链所形成的 7 位点重复区域中, 能够找到一个主要由亮氨酸残基构成的疏水面, 那么由亮氨酸残基组成的疏水面即为亮氨酸拉链区. 两个具有亮氨

酸拉链区的跨膜区, 就能通过疏水作用形成二聚体, 二聚体可以是同源二聚体(homodimer, 即由两个相同的跨膜区组成), 也可以是异源二聚体(heterodimer, 即由两个不同的跨膜区组成).

Langosch 课题组系统地研究了基于亮氨酸拉链区的自组装^[92]. ToxR 分析法研究表明多聚亮氨酸的自聚信号大约是多聚丙氨酸的 4 倍, 同时凝胶迁移率实验证明在不同表面活性剂溶液中, 包含多聚亮氨酸的融合蛋白主要以多聚体的形式存在, 而包含多聚丙氨酸的融合蛋白主要以单体的形式存在. 而如果在保证作用界面亮氨酸不变的情况下, 突变其他位置的亮氨酸为丙氨酸, 如图 5 中 AZ2 保持亮氨酸在 a, d, e 和 g 位, 而将 b, c 和 f 位的亮氨酸都突变为丙氨酸, 得到了与多聚亮氨酸相当的信号. 受磷蛋白(Phospholamban, PL)是由 52 个氨基酸残基组成的钙离子调节蛋白, 其跨膜区通过亮氨酸拉链区的相互作用能够自组装形成五聚体^[93].

钙黏着蛋白(Cadherins)是一个钙调节的细胞黏附分子, 它通过在细胞膜上的自组装实现其功能. 通过序列对比, 在其跨膜区存在保守的亮氨酸拉链区, 并且实验证明亮氨酸拉链区是跨膜区相互作用的驱动力, 如果亮氨酸拉链区被破坏会导致真核细胞中表达的钙黏着蛋白黏附能力的降低^[92].

5 展望

α -螺旋跨膜蛋白已经成为蛋白质研究的热点和难点, 针对生物膜的化学复杂性, 人们发展了一系列相应的化学和生物学方法. 从近几年的研究结果来看, 采用单一的学科方法很难完全解决膜蛋白研究所面临的所有问题, 因此今后膜蛋白研究的发展趋势是: 一

图 5 亮氨酸拉链区模型和相关序列

方面发展新的膜蛋白研究方法;另一方面利用技术的互补性,对现有的膜蛋白分析方法进行整合和优化,形成系统的膜蛋白研究平台,为寻找有效的药物靶标和更多的功能研究提供新的思路和方法。

参考文献

- 1 Liu Y, Engelman D M, Gerstein M. Genomic analysis of membrane protein families: Abundance and conserved motifs. *Genome Biol*, 2002, 3: 0054
- 2 Wallin E, von Heijne G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 1998, 7: 1029—1038
- 3 Yildirim M A, Goh K I, Cusick M E, et al. Drug-target network. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1119—1126
- 4 White S H. The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci*, 2004, 13: 1948—1949
- 5 Schnell J R, Chou J J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 2008, 451: 591—595
- 6 Stouffer A L, Acharya R, Salom D, et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*, 2008, 451: 596—599
- 7 Call M E, Schnell J R, Xu C, et al. The structure of the zeta-zeta transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell*, 2006, 127: 355—368
- 8 Zhu J, Luo B H, Barth P, et al. The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: Integrin α IIb β 3. *Mol Cell*, 2009, 34: 234—249
- 9 Yang J, Ma Y Q, Page R C, et al. Structure of an integrin α IIb β 3 transmembrane-cytoplasmic heterocomplex provides insight into integrin activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17729—17734
- 10 Wang Y, Huang Y, Wang J, et al. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 2009, 462: 467—472
- 11 MacKinnon R, Cohen S L, Kuo A, et al. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, 1998, 280: 106—109
- 12 Rasmussen S G F, Choi H-J, Rosenbaum D M, et al. Crystal structure of the human [bgr]2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007, 450: 383—387
- 13 Yin H, Slusky J S, Berger B W, et al. Computational design of peptides that target transmembrane helices. *Science*, 2007, 315: 1817—1822
- 14 Senes A, Engel D E, DeGrado W F. Folding of helical membrane proteins: The role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*, 2004, 14: 465—479
- 15 Wiener M C, White S H. Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys J*, 1992, 61: 434—447
- 16 Allen J P, Feher G, Yeates T O, et al. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The protein subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6162—6166
- 17 Deisenhofer J, Epp O, Miki K, et al. X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol*, 1984, 180: 385—398
- 18 Deisenhofer J, Michel H. Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO*, 1989, 8: 2149—2170
- 19 Komiya H, Yeates T O, Rees D C, et al. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: Symmetry relations and sequence comparisons between different species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 9012—9016
- 20 Yeates T O, Komiya H, Chirino A, et al. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: Protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 7993—7997
- 21 Yeates T O, Komiya H, Rees D C, et al. Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: Membrane-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6438—6442
- 22 Popot J L, Engelman D M. Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model. *Biochemistry*, 1990, 29: 4031—4037
- 23 Mackenzie K R. Folding and stability of α -helical integral membrane proteins. *Chem Rev*, 2006, 106: 1931—1977
- 24 DeGrado W F, Gratkowski H, Lear J D. How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo-oligomeric helical bundles. *Protein Sci*, 2003, 12: 647—665
- 25 White S H, Wimley W C. Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28: 319—365
- 26 Daley D O, Rapp M, Granseth E, et al. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 2005, 308:

1321—1323

- 27 Granseth E, Daley D O, Rapp M, et al. Experimentally constrained topology models for 51,208 bacterial inner membrane proteins. *J Mol Biol*, 2005, 352: 489—494
- 28 刘宏德, 王睿, 卢小泉, 等. 跨膜蛋白结构预测新方法. *科学通报*, 2007, 52: 2742—2745
- 29 Cserzo M, Wallin E, Simon I, et al. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: The dense alignment surface method. *Protein Eng*, 1997, 10: 673—676
- 30 Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol*, 2001, 305: 567—580
- 31 Kuroiwa T, Sakaguchi M, Mihara K, et al. Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J Biol Chem*, 1991, 266: 9251—9255
- 32 Chen H, Kendall D A. Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem*, 1995, 270: 14115—14122
- 33 Nilsson I, von Heijne G. Breaking the camel's back: Proline-induced turns in a model transmembrane helix. *J Mol Biol*, 1998, 284: 1185—1189
- 34 Lewis R N, Zhang Y P, Hodges R S, et al. A polyalanine-based peptide cannot form a stable transmembrane alpha-helix in fully hydrated phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 2001, 40: 12103—12111
- 35 Zhang Y P, Lewis R N, Hodges R S, et al. Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane alpha-helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: Differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies. *Biochemistry*, 1992, 31: 11579—11588
- 36 Zhang Y P, Lewis R N, Hodges R S, et al. FTIR spectroscopic studies of the conformation and amide hydrogen exchange of a peptide model of the hydrophobic transmembrane alpha-helices of membrane proteins. *Biochemistry*, 1992, 31: 11572—11578
- 37 Bechinger B. Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: A (15)N solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biophys J*, 2001, 81: 2251—2256
- 38 Lew S, Caputo G A, London E. The effect of interactions involving ionizable residues flanking membrane-inserted hydrophobic helices upon helix-helix interaction. *Biochemistry*, 2003, 42: 10833—10842
- 39 von Heijne G. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, 1989, 341: 456—458
- 40 von Heijne G. Membrane proteins: From sequence to structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, 23: 167—192
- 41 Lew S, Ren J, London E. The effects of polar and/or ionizable residues in the core and flanking regions of hydrophobic helices on transmembrane conformation and oligomerization. *Biochemistry*, 2000, 39: 9632—9640
- 42 Li S C, Deber C M, Shoelson S E. An irregularity in the transmembrane domain helix correlates with the rate of insulin receptor internalization. *Biochemistry*, 1994, 33: 14333—14338
- 43 Williams K A, Deber C M. Biophysical characterization of wild-type and mutant bacteriophage IKe major coat protein in the virion and in detergent micelles. *Biochemistry*, 1996, 35: 10472—10483
- 44 Li S C, Goto N K, Williams K A, et al. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6676—6681
- 45 Ren J, Lew S, Wang J, et al. Control of the transmembrane orientation and interhelical interactions within membranes by hydrophobic helix length. *Biochemistry*, 1999, 38: 5905—5912
- 46 Ren J, Lew S, Wang Z, et al. Transmembrane orientation of hydrophobic alpha-helices is regulated both by the relationship of helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration. *Biochemistry*, 1997, 36: 10213—10220
- 47 de Planque M R, Goormaghtigh E, Greathouse D V, et al. Sensitivity of single membrane-spanning alpha-helical peptides to hydrophobic mismatch with a lipid bilayer: Effects on backbone structure, orientation, and extent of membrane incorporation. *Biochemistry*, 2001, 40: 5000—5010
- 48 de Planque M R, Kruijtz J A, Liskamp R M, et al. Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *J Biol Chem*, 1999, 274: 20839—20846
- 49 饶静一, 诸致远, 刘世勇. 环境响应性含多肽杂化三嵌段聚合物的合成及其胶束化行为. *科学通报*, 2009, 54: 1093—1098
- 50 Cunningham F, Deber C M. Optimizing synthesis and expression of transmembrane peptides and proteins. *Methods*, 2007, 41: 370—380
- 51 Dews I C, Mackenzie K R. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20782—20787
- 52 Li R, Gorelik R, Nanda V, et al. Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26666—26673

- 53 Li R, Mitra N, Gratkowski H, et al. Activation of integrin α IIb β 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science*, 2003, 300: 795—798
- 54 Luo S Z, Li R. Specific heteromeric association of four transmembrane peptides derived from platelet glycoprotein Ib-IX complex. *J Mol Biol*, 2008, 382: 448—457
- 55 Ramjeesingh M, Huan L J, Garami E, et al. Novel method for evaluation of the oligomeric structure of membrane proteins. *Biochem J*, 1999, 342 (Pt 1): 119—123
- 56 Rath A, Melnyk R A, Deber C M. Evidence for assembly of small multidrug resistance proteins by a “two-faced” transmembrane helix. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15546—15553
- 57 Thevenin D, Lazarova T, Roberts M F, et al. Oligomerization of the fifth transmembrane domain from the adenosine A2A receptor. *Protein Sci*, 2005, 14: 2177—2186
- 58 Berney C, Danuser G. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophys J*, 2003, 84: 3992—4010
- 59 Jares-Erijman E A, Jovin T M. FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 1387—1395
- 60 Jares-Erijman E A, Jovin T M. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10: 409—416
- 61 Fisher L E, Engelman D M, Sturgis J N. Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain. *J Mol Biol*, 1999, 293: 639—651
- 62 Li E, You M, Hristova K. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and forster resonance energy transfer suggest weak interactions between fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane domains in the absence of extracellular domains and ligands. *Biochemistry*, 2005, 44: 352—360
- 63 Merzlyakov M, Hristova K. Forster resonance energy transfer measurements of transmembrane helix dimerization energetics. *Method Enzymol*, 2008, 450: 107—127
- 64 You M, Li E, Wimley W C, et al. Forster resonance energy transfer in liposomes: Measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment. *Anal Biochem*, 2005, 340: 154—164
- 65 Creighton T E. Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol*, 1986, 131: 83—106
- 66 Cristian L, Lear J D, DeGrado W F. Determination of membrane protein stability via thermodynamic coupling of folding to thiol-disulfide interchange. *Protein Sci*, 2003, 12: 1732—1740
- 67 Cristian L, Lear J D, DeGrado W F. Use of thiol-disulfide equilibria to measure the energetics of assembly of transmembrane helices in phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14772—14777
- 68 Luo S Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, et al. Glycoprotein Ibalph forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet. *Blood*, 2007, 109: 603—609
- 69 Laue T M, Stafford W F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28: 75—100
- 70 Lebowitz J, Lewis M S, Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci*, 2002, 11: 2067—2079
- 71 Tanford C, Reynolds J A. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 457: 133—170
- 72 Langosch D, Brosig B, Kolmar H, et al. Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol*, 1996, 263: 525—530
- 73 Russ W P, Engelman D M. TOXCAT: A measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 863—868
- 74 Gerber D, Sal-Man N, Shai Y. Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization. *J Biol Chem*, 2004, 279: 21177—21182
- 75 Sal-Man N, Gerber D, Shai Y. The identification of a minimal dimerization motif QXXS that enables homo- and hetero-association of transmembrane helices in vivo. *J Biol Chem*, 2005, 280: 27449—27457
- 76 Schneider D, Engelman D M. GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem*, 2003, 278: 3105—3111
- 77 Mansoor S E, Palczewski K, Farrens D L. Rhodopsin self-associates in asolectin liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 3060—3065
- 78 Kota P, Reeves P J, Rajbhandary U L, et al. Opsin is present as dimers in COS1 cells: Identification of amino acids at the dimeric interface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 3054—3059
- 79 Rath A, Tulumello D V, Deber C M. Peptide models of membrane protein folding. *Biochemistry*, 2009, 48: 3036—3045
- 80 Engelman D M, Adair B D, Brunger A, et al. Dimerization of glycophorin A transmembrane helices: mutagenesis and modeling. *Soc Gen Phy Ser*, 1993, 48: 11—21

- 81 Lemmon M A, Flanagan J M, Treutlein H R, et al. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane α -helices. *Biochemistry*, 1992, 31: 12719—12725
- 82 Smith S O, Bormann B J. Determination of helix-helix interactions in membranes by rotational resonance NMR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 488—491
- 83 Smith S O, Jonas R, Braiman M, et al. Structure and orientation of the transmembrane domain of glycophorin A in lipid bilayers. *Biochemistry*, 1994, 33: 6334—6341
- 84 MacKenzie K R, Prestegard J H, Engelman D M. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science*, 1997, 276: 131—133
- 85 Sulistijo E S, Jaszewski T M, MacKenzie K R. Sequence-specific dimerization of the transmembrane domain of the “BH3-only” protein BNIP3 in membranes and detergent. *J Biol Chem*, 2003, 278: 51950—51956
- 86 Schneider D, Engelman D M. Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by α /beta integrins. *J Biol Chem*, 2004, 279: 9840—9846
- 87 Kobus F J, Fleming K G. The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions. *Biochemistry*, 2005, 44: 1464—1470
- 88 Noordeen N A, Carafoli F, Hohenester E, et al. A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1. *J Biol Chem*, 2006, 281: 22744—22751
- 89 Choma C, Gratkowski H, Lear J D, et al. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 161—166
- 90 Zhou F X, Cocco M J, Russ W P, et al. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 154—160
- 91 Zhou F X, Merianos H J, Brunger A T, et al. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 2250—2255
- 92 Gurezka R, Laage R, Brosig B, et al. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem*, 1999, 274: 9265—9270
- 93 Oxenoid K, Chou J J. The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 10870—10875

Folding and self-assembly of α -helix transmembrane protein

ZUO LiMin¹, KANG YanJing¹ & LUO ShiZhong^{1,2}

¹Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

²Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, Ministry of Education, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Given the critical roles of membrane proteins in cellular processes ranging from signal transduction to immune response, as well as the significance of these proteins as drug targets, efforts to understand their structures and functions are vital for human health and diseases. α -Helix transmembrane protein is a significant and common membrane protein. This paper reviews the recent progress of its folding and self-assembly, presenting an overview of the two-stage model and structural bases for transmembrane association and introducing the novel chemical and biological method for the studies of folding and self-assembly of α -helix transmembrane protein.

α -helix transmembrane protein, folding, self-assembly, two-stage model

doi: 10.1360/972009-2573