



自然科学基金项目进展专栏

评述

化学生物学专刊

利用光交联探针研究 pH 值调控的蛋白-蛋白相互作用

刘君, 张萌, 陈鹏*

北京大学化学与分子工程学院化学生物学系; 北京分子科学国家实验室(筹); 北京大学合成与功能生物分子中心, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: pengchen@pku.edu.cn

收稿日期: 2012-05-30; 接受日期: 2012-08-06; 网络版发表日期: 2012-10-10

doi: 10.1360/032012-329

摘要 pH 值是几乎影响到所有蛋白质分子表面电荷分布和相关结构变化的关键因素, 许多蛋白质分子之间的相互作用也受到 pH 值的调控. 近年来, 基于非天然氨基酸的光交联探针被广泛应用于捕捉活细胞内的蛋白-蛋白相互作用. 然而, 由于环境 pH 值的改变往往导致蛋白质分子结构、带电性质的显著变化, 因此现有的非天然氨基酸光交联探针难以在极端 pH 值条件下对相互作用的蛋白质分子的捕获和研究. 本文将介绍本课题组新近发展的基于烷基双吡丙啶活性基团的非天然氨基酸光交联探针-DIZPK, 通过这一探针, 我们成功捕获到大肠杆菌中一种重要的酸性分子伴侣 HdeA 在膜间质内酸性胁迫过程中的作用对象. 在捕获到的 HdeA 底物中, 我们发现了两个膜间质中重要的分子伴侣蛋白: DegP 和 SurA. 通过实验我们证明了在酸性胁迫条件下, DegP 和 SurA 能够被 HdeA 保护不形成聚集体, 并进而在随后的回复中性过程中能够协助 HdeA 对其他底物进行重折叠. 这种不依赖于 ATP 的分子伴侣间协作模式可能起到了帮助肠道型细菌抵抗酸性胁迫的功能. 基于上述实验结果, 我们提出了一个“分子伴侣协同作用”的模型, 用以阐释细菌利用抗酸性分子伴侣提高其在酸胁迫下逃逸的机理. 推而广之, 在原核和真核细胞中定点引入高可适性的非天然氨基酸光交联探针可广泛适用于在活体内探测众多的由 pH 值调控的蛋白-蛋白相互作用.

关键词非天然氨基酸
光交联探针
蛋白相互作用
pH 值调控
酸性分子伴侣

1 引言

蛋白-蛋白相互作用对细胞内的各种生命过程都发挥着极其重要的作用. 无论是由细胞的核糖体合成, 还是从外部环境引入, 细胞内的蛋白质一般都需要通过相互作用形成一个网络, 以便准确地发挥其在体内的功能^[1, 2]. 蛋白质的构象以及表面电荷在介导蛋白-蛋白相互作用方面发挥着关键的作用. 由于 pH 值是定义蛋白质表面电荷及相关结构性质的一个决定性因素, 不难想象, 许多蛋白-蛋白相互作用会

受到 pH 值的直接调控^[3]. 例如, 在哺乳细胞的胞吞和胞吐过程中都涉及到由 pH 值调控的蛋白之间相互作用. 胞吞过程中, 从早期的核小体到晚期的溶酶体 pH 值逐步降低, 这对于吞入的一些配体(例如蛋白质分子)的重新分布调整和降解是必须的; 但是在胞吐过程中恰恰相反, 当货物蛋白穿行至细胞表面时, 涉及到的细胞器内 pH 会逐步增高^[4]. 在这些过程中, 细胞内不同细胞器中 pH 梯度的正确维持是保证蛋白在细胞中有效迁移的关键因素, 其中很多取决于 pH 调控的蛋白-蛋白相互作用都发挥了重要的作用^[3].

此外,一些原核生物(例如大肠杆菌和幽门螺旋杆菌)通常都会面临极端的 pH 值环境,它们由此发展出了有效地抵御强酸性侵蚀的机制来保护自己通过或者寄居于哺乳动物的胃液当中^[5].在肠道型细菌(例如大肠杆菌)的膜间质内存在着一类酸性分子伴侣,当遇到酸性胁迫时,它们可与众多的酸变性蛋白直接结合以保护其不会形成对细胞有毒性的错误折叠蛋白或蛋白质聚集体;而在幽门螺旋杆菌内,则存在着一个极其精密的由相互作用的蛋白组成的网络来感应极端酸性的外部环境并产生缓冲效应^[6, 7].因此,对于细胞内由 pH 值调控的蛋白-蛋白相互作用的研究将有效地增加我们对 pH 值变化引发的体内众多蛋白质相互作用分子机制的了解.然而,到目前为止,对体内由 pH 值调控的蛋白之间瞬时相互作用的研究却是十分困难的.

蛋白质光交联首先向活细胞内的目标蛋白质定点引入具有光交联活性的非天然氨基酸,然后通过光诱导激活该交联探针,使其在目标蛋白或与之相互作用的靶蛋白之间形成共价键,实现对蛋白质相互作用复合物的捕捉.近年来,该方法已经发展成为用于在体内捕捉蛋白-蛋白相互作用的有效工具^[1, 8-14].与一些传统方法相比,该方法弥补了它们在“共价捕获”等能力上的缺失以及只能实现体外检测的不足,具有较大的优势^[1].然而,虽然目前所发展的一些光交联探针可以实现活体内对相互作用的蛋白质分子复合物进行捕捉和研究,但这些探针尚不能满足在低 pH 条件下捕捉蛋白-蛋白相互作用的要求.究其原因,主要是由于 pH 调控的蛋白质结合和解离过程通常会伴随着相关蛋白质构象的显著变化,这使得大多数现有的光交联探针包括 pBpa(*p*-苯酰苯基丙氨酸)限于其相对刚性的结构或较低的反应效率,很难用于检测由 pH 调控的蛋白-蛋白相互作用^[11, 12, 14].我们最近发展出一种十分高效并具有柔性结构的非天然氨基酸光交联探针 DIZPK(该化合物的中文名称:3-(3-甲基-3H-双吡丙啶-3-基)-异丙羰基-*N*-L-赖氨酸;英文名称:3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)-propamino-carbonyl-*N*^c-L-lysine).该探针携带有高反应活性的亲光性烷基双吡丙啶基团^[15](图 1).在 365 nm 光照激发下,双吡丙啶基团通过脱去一份子氮气产生活性极高的卡宾分子(半衰期一般在纳秒范围).由于卡宾分子能够高效快速地插入到周围的碳-氢键(或氮-氢键、氧-氢键)当中形成共价结合的产物,该类探针

可以作为光诱导的交联试剂对蛋白质相互作用进行特异、定点的捕捉.该反应所产生的碳卡宾会优先与邻近基团的化学键发生反应,对与之共价结合的底物没有选择性.因此,在用于捕捉蛋白-蛋白相互作用时,其特异性主要来自于蛋白质相互作用界面的具体构象和残基序列等空间选择性,以及用于在蛋白质上展示该探针的特异位点等.此外,在实际应用中,上述反应的交联效率将受到周围溶剂、蛋白质结构/构象,氨基酸残基等因素的影响.在 DIZPK 分子当中连接赖氨酸和双吡丙啶基团之间的柔软的烷烃链,既提高了探针的灵活性,又可以捕获到距离为 10 Å 范围内的作用分子,增加了它的“有效作用半径”.这一特点在蛋白质结构信息所知甚少的情况下是极其有用的(图 2(a)).此外,相较于其他光激活探

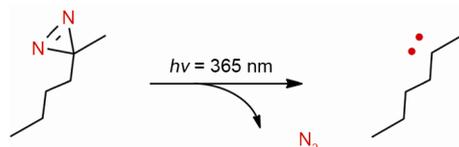


图 1 基于双吡丙啶(diazirine)的光交联探针的反应机理

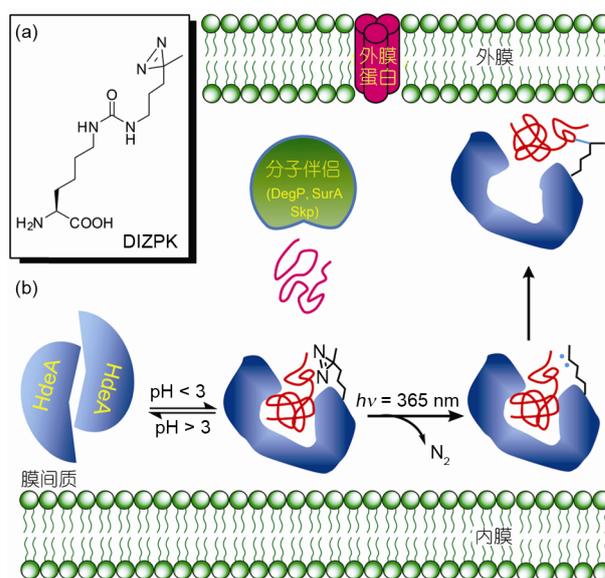


图 2 插入非天然氨基酸 DIZPK 用于体内探测 HdeA 在酸性胁迫下的保护底物模式示意图。(a) 光交联探针 DIZPK 化学式.包含有一分子双吡丙啶基团,光照下会脱去一分子氮气形成高活性的卡宾基团发挥交联作用;(b) 膜间质分子伴侣 HdeA 酸性条件下会由二聚体解聚,暴露出疏水面与底物蛋白结合,保护膜间质蛋白不会聚集.利用光交联探针可于体内探测 HdeA 与底物的相互作用

针如二苯甲酮(benzophenone)或苯基叠氮(phenyl azides)等基团而言, 双吡丙啶上的烷基基团还存在较小的空间位阻, 使潜在的对蛋白质活性的影响降至最小. 综上, DIZPK 在结构和活性方面的特征使其对 pH 介导的蛋白质结构变化适应性更强. 我们近期与北京大学生命学院的昌增益教授合作发表的研究结果表明, 在 pH 2 时, DIZPK 成功地捕获了大肠杆菌内一种酸性分子伴侣蛋白 HdeA 在膜间质中的作用对象(图 2(b))^[15]. 由此我们展望, DIZPK 能够成为一种适用于较广的 pH 范围、能在活细胞内系统地捕捉 pH 调控的蛋白-蛋白相互作用的光交联探针.

2 捕捉 pH 调控的蛋白-蛋白相互作用

在革兰氏阴性菌的膜间质环境中, 具有分子伴侣-蛋白酶双功能的蛋白质质量控制因子 DegP 同 SurA 和 Skp 一起, 建立了一个必要的蛋白质质量控制系统来保证外膜蛋白的运输与正确折叠(图 3)^[16]. 由于外膜对于小分子(分子量 < 600 Da)有较高的通透性, 细菌膜间质中的蛋白质分子相较于胞质内的蛋白所处的环境更加恶劣, 因此需要特殊的保护. 对于包括大肠杆菌在内的肠道型细菌而言, 它们在通过哺乳动物极端酸性的胃部环境(pH 1~3)到达主要的侵染区域小肠的过程中, 膜间质蛋白会面临十分严峻的酸性胁迫. 先前的一些研究表明, HdeA 在极端酸性的环境下, 对于维持膜间质蛋白的完整性起到了重要的作用^[17]. 近期的研究表明, 中性情况下为二聚体的 HdeA 蛋白, 在 pH 值降至 3 以下时会转变成具有高可塑性构象的单体形式, 并且发挥其作为分子伴侣的活性来有效地阻止酸变性导致的膜间质蛋白聚集^[15]. 然而在活细胞内, 酸性胁迫过程中 HdeA 保护了哪些蛋白, 如何发挥保护作用, 被保护的蛋白在环境恢复中性的过程中是否被释放, 释放之后的命运如何都是之前没有答案且十分有趣的问题. 此外, 蛋白质之间的相互作用会随着环境的 pH 值从中性到酸性的变化而发生瞬时而显著的改变, 强酸性会导致包括抗体蛋白和转移因子等大多数蛋白失活, 因此通常用于研究蛋白之间相互作用的一般方法, 例如共免疫沉淀(基于抗体)或者酵母双杂交(基于报告基因)等, 在如此极端的 pH 值条件下是不适用的. 而光交联探针并不会受 pH 值变化的影响, 共价交联的蛋白质复合物也不会随 pH 值的变化而解离^[15]. 基

于此, 在之前的工作中, 我们利用 DIZPK 在大肠杆菌膜间质中捕获了 HdeA 的作用底物, 由此来证明我们提出的新概念.

我们利用一套 tRNA 合酶/tRNA 的正交系统, 将 DIZPK 探针定点插入到 HdeA 中. 我们首先对 DIZPK 的光交联效率进行了检验. 将 DIZPK 和光交联探针 pBpa 分别插入到 HdeA 的同一位点(Phe28), 中性条件下孵育并紫外光照后对其交联底物进行免疫蛋白印迹法分析. 我们发现, DIZPK 在紫外照射 1 min 后可以实现 60% 的光交联效率, 3 min 内可以达到其最大效率 80%; pBpa 在光照 1 min 后只能达到小于 30% 的光交联效率, 而其实现最大效率 40% 需要光照 5 min 以上. 随后我们还对 HdeA 的其他两个二聚体相互作用面上的位点(Phe35 和 Ala38)进行了检验, 结果发现 DIZPK 均表现出与 Phe28 相似的光交联效率, 而将 pBpa 插入到 HdeA35 位并通过紫外光照 10 min 后, 仍然没有检测到光交联产物. 从而我们证明了 DIZPK 相较于传统的光交联探针 pBpa 具有更高的光交联效率和对结构的可适性.

接着, 我们将 DIZPK 插入到 HdeA 的不同位点, 在活细胞内强酸性条件下捕获 HdeA 的膜间质作用底物. 利用免疫蛋白印迹法分析光交联产物, 我们发现突变位点处于疏水区域的 HdeA 突变体, 得到较多的交联产物条带. 而突变位点选在靠近 N 端或者 C 端亲水区域的 HdeA 突变体, 则无法检测到交联产物条带, 仅显示出明显的 HdeA 单体条带, 这和之前的推测基本一致, 表明 HdeA 是利用其疏水区域与底物分子结合的^[18]. 根据一系列质谱的分析结果, 结合免疫蛋白印迹法, 我们进一步确证了 HdeA 的交联产物中包括 DegP 和 SurA, 但是不含 Skp 和 OmpF(一种主要的外膜蛋白). 在用分子排阻层析的方法验证后, 我们用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法对于低 pH 值下 HdeA 与其交联产物的相互作用进行了检验. 我们分别用 Alexa488 和 Cy3 染料对 HdeA 和它的作用底物进行标记, FRET 结果表明, DegP 和 SurA 存在与 HdeA 的相互作用, 它们的结合 K_D 值分别是 340 和 60 nmol/L. 同质谱分析结果一致, Cy3 标记的 Skp 与 Alexa488 标记的 HdeA 并没有明显的 FRET 信号, 表明二者几乎不存在相互作用.

接下来, 我们利用光散射的方法检测了酸性环境下 HdeA 与 SurA 和 DegP 在不同摩尔比的条件下, 抑制蛋白聚集的情况. 数据表明, SurA 在低 pH 值下,

会迅速聚集, 聚集体在随后回复中性的过程中不可溶, 而 HdeA 的存在则可以有效地抑制聚沉的发生. DegP 在面临低 pH 值时聚集并不明显, 但在随后回复中性的过程中会发生迅速的聚沉, 这种聚集同样可以在 HdeA 存在的情况下被抑制. 尽管在之前的报道中^[19], HdeA 的模式底物蛋白 MDH 也存在中性回复的过程中沉降会比酸胁迫时更严重的情况, 但是与之相比, 我们观察到的 DegP 在酸性条件可溶, 而仅在回复中性的过程中聚集的情况仍然是比较特殊的. 我们随后利用荧光光谱的方法检测了荧光探针 ANS (1-anilino-8-naphthalenesulfonate) 结合蛋白质分子疏水区域的情况, 我们发现 DegP 在 pH < 3 的时候会去折叠, 暴露较多的疏水面. 对于这种现象较为合理的解释是, DegP 会在酸性条件下形成去折叠但却可溶的相对稳定的构象, 而在随后回复中性的过程中, DegP 自身无法正确折叠, 发生聚沉. HdeA 则可以在酸性条件下与 DegP 暴露出的疏水面结合, 稳定 DegP 的结构, 并在随后的回复中性过程中保护其不会聚集, 帮助重折叠. 进一步的研究中, 我们对质谱结果中不是 HdeA 交联产物的蛋白 Skp 在酸性胁迫和回复过程中的聚集情况进行了光散射验证. 我们发现, Skp 在酸性条件下并不发生明显的聚沉, 而且在回复中性的过程中, Skp 也并没有发生大量的聚沉, 荧光探针 ANS 的结合情况表明, 在酸性条件下, 同 DegP 相比, Skp 会暴露出较少的疏水面. 综合这些实验结果, 我们认为, 在酸胁迫下蛋白暴露出疏水面的大小似乎是调控其与 HdeA 是否发生相互作用的主要因素, 这与先前的一些报道结果也相吻合.

在证明了 SurA 和 DegP 是 HdeA 在酸性胁迫下的保护对象之后, 我们进一步考察了这两个大肠杆菌膜间质中重要的质量控制因子是否在抗酸过程中与 HdeA 协同发挥了重要的作用. 我们利用膜间质中的碱性磷酸酶作为模式蛋白, 通过检测其酶活性恢复的情况, 对酸性胁迫后回复中性的过程中 DegP 和 SurA 帮助 HdeA 保护的其他底物蛋白进行重折叠的情况进行了研究. 结果表明, 无论是在酸性条件或是随后的中性回复过程中加入 SurA 或 DegP, HdeA 帮助底物分子(如碱性磷酸酶)重折叠的能力均有成倍数的增加. 因此我们认为, HdeA 保护的 SurA 和 DegP 会在酸胁迫之后回复中性的过程中, 作为分子伴侣帮助 HdeA 保护的其他底物蛋白进行重折叠.

在上述报道中, 我们通过发展一种高效的非天然氨基酸光交联探针 DIZPK, 成功的对大肠杆菌膜间质中酸性分子伴侣 HdeA 在活细胞内的作用底物进行了考察. 更进一步的研究中, 我们发现了膜间质中两种重要的分子伴侣 DegP 和 SurA, 它们首先在酸性胁迫下被 HdeA 保护, 并进而在回复中性的过程中与 HdeA 协同作用帮助其它底物分子重折叠成具有活性功能的蛋白质(图 3). 由于极端酸性胁迫是一种十分强烈和直接的环境刺激, 它将使绝大多数蛋白失去功能, 因此在膜间质中专门发挥酸性保护作用的分子伴侣 HdeA 可能会通过保护类似于 DegP 和 SurA 这样的分子伴侣, 使得它们在回复中性过程中发挥分子伴侣活性, 继而帮助下游蛋白重折叠. 在后续的研究中, 我们还考虑采用分子建模的方法来对 HdeA 在回复过程中帮助底物重折叠及抑制聚集的过程进行动力学模拟, 这部分的工作我们正在和相关的理论人员合作展开.

此外, 尽管到目前为止, 人们对 HdeA 的研究和了解已经较为深入, 但对于和 HdeA 位于同一个操纵子上的同源酸性分子伴侣蛋白 HdeB 的功能和机理却所知甚少, 相关报道表明, 在酸性胁迫下, HdeB 发生于 HdeA 相似的构象变化, 从二聚体解聚成为单体, 暴露出疏水面同大肠杆菌膜间质中的酸变性蛋白结合阻止其形成不可逆的蛋白聚集体^[21, 22]. 但 HdeB 在细菌内的作用对象和功能都不得而知. 这引发我们

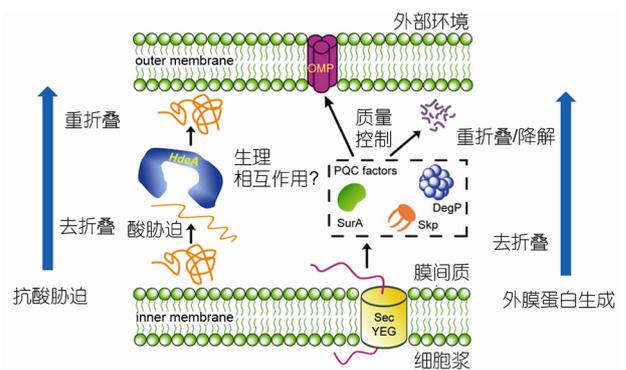


图 3 HdeA 的酸性保护作用同膜间质质量控制系统的关系模式示意图. SurA, Skp 同 DegP 是大肠杆菌膜间质中重要的蛋白质质量控制因子(Protein Quality Control Factors, PQC factors), 它们在外膜蛋白的生成, 运输与组装的过程中发挥重要的作用. 酸性胁迫下, HdeA 会通过去折叠的膜间质蛋白结合保护其不会聚集. HdeA 可能与其它的膜间质质量控制因子共同作用, 发挥抗酸的保护作用

思考一个问题, 在生物体进化的如此精简的模式下, 大肠杆菌内为何要同时存在两个相似的酸性伴侣蛋白? 一些体外的研究表明, 相较于 HdeA 在 pH 2 的时候对底物有较强的保护作用, HdeB 似乎在 pH 3 的时候对底物的保护作用更强^[21]。由此, 我们拟对这两种蛋白在功能上的差别进行进一步的研究。通过插入 DIZPK 探针的方法, 我们拟在活细胞内对 HdeB 的底物及其保护作用进行捕捉和研究; 同时结合体外实验进行验证。一些初步结果表明, 在酸性条件下, HdeB 结合的蛋白与 HdeA 的底物是不同的, 另外, 两种蛋白发挥酸性保护作用的 pH 值范围也不同(图 4)。因此, 在酸性胁迫条件下, 大肠杆菌中的 HdeA 和 HdeB 两个伴侣蛋白可能发挥了协同作用来保护膜间质中的蛋白不被聚集。关于二者相互协同保护的细节, 尚待进一步的研究。

3 总结与展望

综上所述, 通过我们自行发展的一个高交联效率和适应性的光交联探针 DIZPK, 我们首次揭示了大肠杆菌中的一种在极端酸性胁迫下用于保护细菌膜间质蛋白完整性且不依赖于 ATP^[20]的分子伴侣间协同作用的机制。后续研究表明在酸性条件下, HdeA 对于底物有一定的选择性, 通过质谱分析, 我们还掌握了体内 HdeA 具体的作用底物。这些结果对

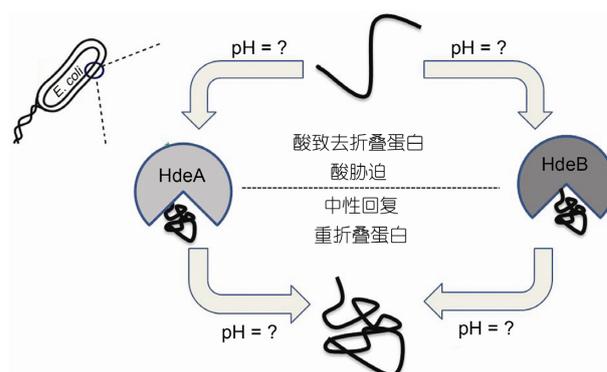


图 4 大肠杆菌膜间质中 HdeA 和 HdeB 共同发挥酸保护作用模式示意图。在酸性压力下, HdeA 和 HdeB 均会与膜间质中的底物蛋白结合, 保护其不会聚集; 在酸性回复过程中, HdeA 和 HdeB 会帮助底物蛋白重折叠。HdeA 和 HdeB 在酸性条件下保护底物的 pH 窗口可能存在一定的区别, 还有待进一步的研究。

于将来进一步探索肠道细菌中由 HdeA 调节的酸性保护机制, 并发展出阻止肠道型细菌侵染的方法, 有着重要的意义。此外, 发展该光交联探针时所采用的基于吡咯赖氨酸的遗传基因密码子拓展体系, 目前能够广泛地适用于包括细菌、酵母、哺乳动物细胞在内的多种原核与真核细胞, 甚至是线虫、果蝇等动物体内。因此, 该光交联探针将极有可能成为一种在细胞以及活体动物当中研究由 pH 值调控的蛋白-蛋白相互作用的重要工具。

致谢 本工作得到国家自然科学基金委员会重大研究计划项目(91013005)和科技部重大科学研究计划(2010CB912302, 2012CB917301)的资助, 特此致谢。

参考文献

- 1 Tanaka Y, Bond MR, Kohler JJ. Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells. *Mol Biosyst*, 2008, 4: 473–480
- 2 Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 1999, 286: 1888–1893
- 3 Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 50–61
- 4 Demarex N. pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci*, 2002, 17: 1–5
- 5 Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 330–343
- 6 Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 349–369
- 7 Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 898–907
- 8 Ai HW, Shen W, Sagi A, Chen PR, Schultz PG. Probing protein-protein interactions with a genetically encoded photo-crosslinking amino acid. *Chembiochem*, 2011, 12: 1854–1857
- 9 Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2005, 2: 261–267

- 10 Tippmann EM, Liu W, Surnmerer D, Mack AV, Schultz PG. A genetically encoded diazirine photocrosslinker in Escherichia coli. *Chembiochem*, 2007, 8: 2210–2214
- 11 Majmudar CY, Lee LW, Lancia JK, Nwokoye A, Wang Q, Wands AM, Wang L, Mapp AK. Impact of nonnatural amino acid mutagenesis on the *in vivo* function and binding modes of a transcriptional activator. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14240–14242
- 12 Hino N, Okazaki Y, Kobayashi T, Hayashi A, Sakamoto K, Yokoyama S. Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nat Methods*, 2005, 2: 201–206
- 13 Hancock SM, Uprety R, Deiters A, Chin JW. Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 14819–14824
- 14 Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11020–11024
- 15 Zhang M, Lin S, Song X, Liu J, Fu Y, Ge X, Fu X, Chang Z, Chen PR. A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 671–677
- 16 Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli. *Genes Dev*, 2007, 21: 2473–2484
- 17 Zhao BY, Houry WA. Acid stress response in enteropathogenic gamma-proteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88: 301–314
- 18 Wu YE, Hong W, Liu C, Zhang L, Chang Z. Conserved amphiphilic feature is essential for periplasmic chaperone HdeA to support acid resistance in enteric bacteria. *Biochem J*, 2008, 412: 389–397
- 19 Tapley TL, Korner JL, Barge MT, Hupfeld J, Schauerte JA, Gafni A, Jakob U, Bardwell JCA. Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 5557–5562
- 20 Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16: 574–581
- 21 Kern R, Malki A, Abdallah J, Tagourti J, Richarme G. Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol*, 2007, 189: 603–610
- 22 Malki A, Le HT, Milles S, Kern R, Caldas T, Abdallah J, Richarme G. Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. *J Biol Chem*, 2008, 283: 13679–13687

Probing pH mediated protein-protein interactions via photocrosslinking

LIU Jun, ZHANG Meng, CHEN Peng*

Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University; Beijing National Laboratory for Molecular Science(to arrange); Synthetic and Functional Biomolecules Center, Peking University, Beijing 100871, China

*Corresponding author (email: pengchen@pku.edu.cn)

Abstract: Diverse protein-protein interactions are mediated by pH, a key parameter in dictating the charge and structure of nearly all proteins. Although photocrosslinking is powerful in trapping transient protein interactions in living cells, the pH-dependent protein interactions are exceedingly difficult to capture, largely due to the significant change of the protein binding interfaces upon pH variations. Here, we report that our newly developed alkyl diazirine-based unnatural amino acid photocrosslinker-DIZPK is capable of detecting the *in vivo* substrates of HdeA, a major acid-protection chaperone. Among the identified substrates of HdeA, we found two important periplasmic chaperone proteins: DegP and SurA, that were protected by HdeA at a low pH, but subsequently assist the HdeA-mediated recovery of other client proteins. This ATP-independent chaperone cooperation may enhance the acid resistance of enteric bacteria. Based on these results, we proposed a “chaperone cooperation” model in order to illustrate how acid-protection chaperones are employed by enteric bacterial to cope with acid stress. The highly adaptable photocrosslinker presented here can be generally applicable for surveying various pH-dependent protein-protein interactions in prokaryotic and eukaryotic cells.

Keywords: unnatural amino acid, photocrosslinker, protein interactions, pH mediated, acid chaperone protein