

荧光共振能量转移动态检测蛋白质相互作用的研究进展

王宏¹ 蔡欣¹ 白波² 陈京^{2Δ}

(¹ 泰山医学院基础医学院, 山东 泰安 271016; ² 济宁医学院神经生物学研究所, 山东 济宁 272067)

摘要 荧光共振能量转移(FRET)技术是近10年来出现的一种新的检测蛋白质-蛋白质相互作用的技术。它的最大优势是能“时间、空间、动态、连续”对活细胞中蛋白质之间的相互作用进行检测,该技术不但可以与其他技术结合起来研究细胞膜上蛋白质之间的相互作用;而且还可用于分析细胞膜-细胞质-细胞核中所发生的信号转导途径。资料显示,FRET技术所发挥作用是最近出现的几种技术所无法企及的,这对于疾病发病机制的研究及新的药物靶点的发现具有深远意义。

关键词 荧光共振能量转移;蛋白质-蛋白质相互作用;信号转导

中图分类号: Q274 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)02-060-04

机体细胞中种类繁多的蛋白质各具不同的生理功能,从而使细胞对胞外信号做出不同的生物学反应。蛋白质的功能作用经常受不同条件下与不同配体间相互作用的调节。蛋白质之间的相互作用能够整合来自不同信号通路的信号并协调细胞内部的调节机制^[1]。因此,研究蛋白质之间相互作用能够给这些研究提供新的见解。在过去的20年中,已经开发了很多用于探测蛋白质相互作用的技术和方法,这些技术一般分为两部分,1)体外方法,例如免疫共沉淀、far-western blot、GST融合蛋白沉降技术等;2)体内方法,例如酵母双杂交系统,但是这些方法都具有一定的局限性。一方面,基于机械的、离心力高的或去垢剂的细胞裂解,上述方法都可能会改变蛋白质-蛋白质相互作用的自然状态;另一方面,上述技术无法提供活细胞内的特定蛋白间相互作用的时空信息^[2]。近年来研究开发的荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)却能克服以上缺点,可以在活细胞中实时动态观测蛋白质之间的相互作用。更重要的是, FRET还可以与其他技术结合^[3],如生物发光共振能量转移(BRET)、蛋白互补技术(PCAs)等,既能研究两个蛋白之间的相互作用,还能用来研究3个或更多蛋白之间的相互作用,甚至是对信号网络的研究。本文就FRET、FRET与其他一些技术的结合及其应用做一简要综述。

1 荧光共振能量转移(FRET)技术的原理

FRET理论描述的是两个荧光团之间的能量转移(图1)。在能量传输过程中,其中的一个荧光团作为能量供体(D),另一荧光团作为能量受体(A)。以适当的激发光照射D,将会产生振荡偶极子,如果D的基态和A的第一激发态的振动能量差相当,或者D的发射光谱与A的吸收光谱能有效重叠时,当D与A靠近时,或者说D与A的偶极子之间的距离足够近时即能产生共振,通过偶极-偶极耦合作用将能量从D向A转移,即发生非放射能量共振转移;A接受能量从而发射出特异性荧光。在此共振能量转移过程当中,D特异性荧光的衰减或者A特异性荧光的增强即可被检测到,从而实现FRET检测^[4]。

FRET中两个常用的荧光蛋白为青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)。FRET具有广泛的应用前景,在蛋白质、DNA等复合物的研究方面发挥重要作用。Khan等^[5]用FRET检测出溶血磷脂胆碱能够通过迅速磷酸化和内化来快速激活G2A, G2A的活化能促使Gai-1和Gaq/11和Gβγ的释放, Gai-1和Gaq/11会使胞质内的Ca²⁺浓度升高及G2A的激活促使GRK6和β-arrestin的循环利用;而Gβγ能够与激活的Hck相互作用。Kazutoshi Yoshitake等^[6]构建了一对融合的锌指结构蛋白,它们是一种具有N端二聚化序列和C端GFP突变体的荧光传感蛋白。他们分别在锌指结构的末端标记GFP的突变体CFP和YFP,将这一对锌指结构蛋白混合,并且加入特异

* [基金项目]国家自然科学基金资助项目(30971081;30870932;81070961);山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2011CM027;ZR2009DZ004);山东省泰山学者专项基金

Δ [通信作者]陈京, E-mail: jingchen@warwick.ac.uk

性的双链 DNA,作者观察到了 FRET 现象。随后加入非特异性的双链 DNA,没有观察到 FRET 明

显的改变,这表明了特异性的双链 DNA 发生了二聚化作用。

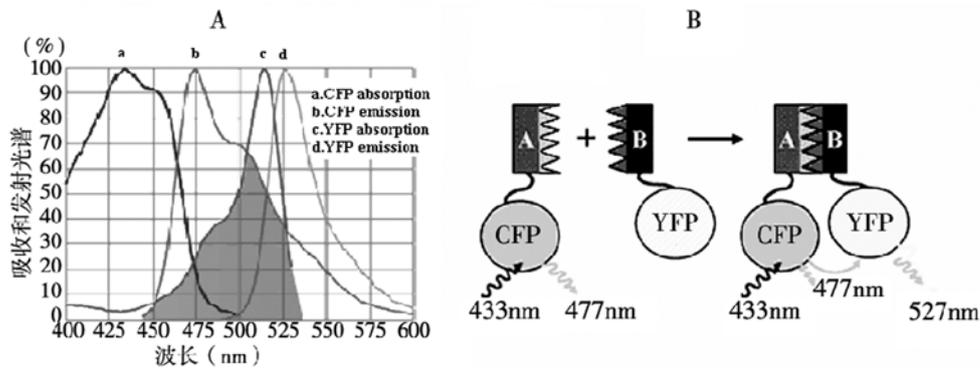


图 1 FRET 的基本原理

A. CFP(供体)和 YFP(受体)的吸收和发射光谱。CFP 发射光谱区域与 YFP 吸收光谱区域重叠处引起有效的 FRET 信号;
B. FRET 的原理示意图。

2 FRET 技术与其他一些技术的结合及应用

2.1 连续共振能量转移

FRET 涉及不同发射光谱的两个荧光蛋白的能量转移,而 BRET 是非辐射的生物发光能量转移到一个荧光蛋白上。FRET、BRET 已经广泛用于检测活细胞中结构蛋白和动态蛋白的相互作用,这两种技术的自由组合,即 FRET-BRET^[7]、BRET-BRET、FRET-FRET 以及 3-FRET(统称 sequential resonance energy transfer, SRET)等所发挥的作用是最近出现的几种技术单独应用所无法企及的,这些测定法可以测定相互作用的蛋白在亚细胞定位中的作用、实时观测影响多个蛋白复合

体的动态事件等,这些方法可以被用来研究活细胞中一系列蛋白质复合体的组装和功能。

2.1.1 高阶寡聚体 利用这两类技术的特性将这两种能量转移技术结合起来可以实时检测活细胞中多个蛋白质之间的相互作用(图 2)。目前,已经用 SRET 技术实时检测到 A2AR-D2R-CB1R 寡聚体^[8]和 $\alpha 1b$ 肾上腺素寡聚体^[9]。这些寡聚体的研究是非常重要的,他们拥有独特的结构和信号通路从而改变了原受体蛋白的功能,例如如果对 $\alpha 1b$ 肾上腺素寡聚体进行突变可以发现细胞的迁移和功能有重大变化,另外,这些寡聚体的独特性为新型药物开发也开启了新的天地。

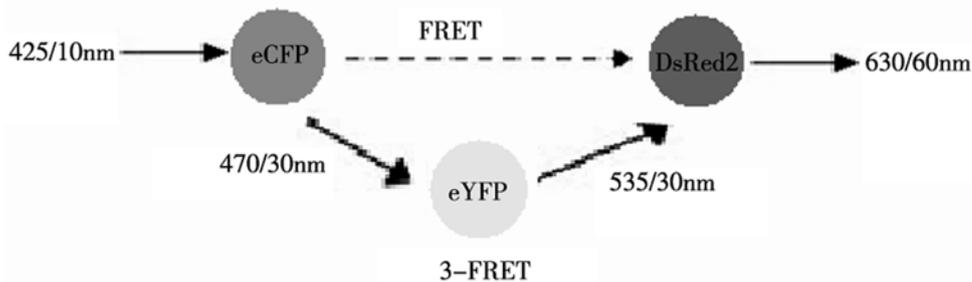


图 2 3-FRET 技术结合的作用原理

2.1.2 信号转导 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)的信号转导日益复杂化,这些事件的基础是 GPCRs 和相关靶分子(例如 G 蛋白偶联受体激酶和 β -arrestin)之间存在着蛋白质相互作用。应用 BRET 与 FRET 联合应用的方法能够检测这些蛋白质之间的相互作用从而有助于揭示 GPCRs 的脱敏,内化,运输,合成和再循环等整个信号转导过程。例如 BRET_{400-GFP}-FRET_{GFP-YFP} 和 BRET_{480-YFP}-FRET_{GFP-YFP}, BRET_{400-GFP}

涉及腔肠素的氧化和能量转移到 uvGFP(UV-excited green FP), BRET_{480-YFP} 涉及腔肠素的氧化和能量转移到 eYFP,而 uvGFP 和 eYFP 又是 FRET 中的完美搭档,由此可见细胞中 3 个不同蛋白之间可能存在的相互作用也可以被实时动态检测,因此,如果将 3 者结合起来,即 BRET_{480-YFP}-BRET_{400-GFP}-FRET_{GFP-YFP} 则可以检测同一个活细胞中多个蛋白之间的相互作用。Breton 等^[10] 人用 BRET_{480-YFP}-BRET_{400-GFP}-FRET_{GFP-YFP} 证实出刺激

α_{2A} AR 会使 GRK2 聚集于该受体上, 而该受体仍然能与 $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ 偶联。激酶能同时与 $G\alpha_{q/11}$ 、 $G\beta_1\gamma_2$ 偶联, 并能与受体相互作用, 这一现象还可以用于解释 GRK2 的非磷酸化作用。因此, 能量转移结合技术能够揭示出 GPCR 信号转导中不可预期的动力学过程并且该技术适用于多个生物系统, 这有助于揭示相关疾病发生的分子机理, 探寻相关疾病治疗的新突破点及开发新药。

2.2 PCAs-FRET

这种结合技术主要 PCAs、FRET 两类技术的自由组合, 如 BIFC-FRET-BIFC、BIFC-FRET^[11] 等, 主要的原理是把荧光蛋白和发光蛋白的 N 端或 C 端融合到目标受体上, 并且让这些受体表达在同一个细胞上, 如果这些受体能相互作用, 这会产生能量转移, 即发生 FRET。BIFC-FRET-BIFC 运用 BIFC 中荧光蛋白的重新组合可以分别作为 FRET 中的受体和供体(图 3)。

2.2.1 高阶寡聚体和蛋白质复合体的亚细胞定位

FRET-PCAs 的结合应用能够同时识别多个 GPCRs 形成的寡聚体, 有资料显示, FRET-BiFC 实验表明出 AP-1-NF-kappaB 蛋白复合体的存在^[12], BRET-BiFC 也证实出多巴胺 D2 受体、腺苷 A_{2A} 受体以及亲代谢型谷氨酸受体能形成三聚体。众所周知, 蛋白质在内质网上进行生物合成, 经高尔基体修饰并运输至质膜上表达, 因为 FRET 可以成像, 所以 FRET-BiFC 在实时观测复合体形成的同时还可以对蛋白质复合体进行亚细胞定位(如细胞膜、内质网、高尔基体等)^[13], 从而有助于我们研究蛋白质, 甚至是高阶寡聚体的生物合成过程。

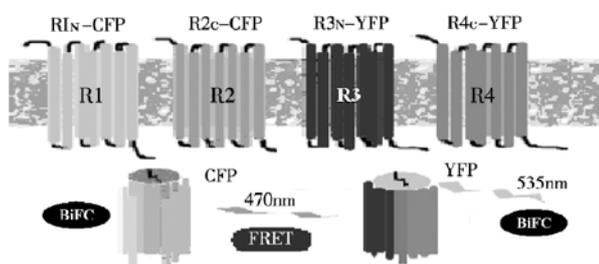


图 3 BIFC-FRET-BIFC 技术结合的作用原理

两个荧光蛋白被分成 2 个非荧光片段, 这 4 个片段分别依次标记与 4 个不同的蛋白质上, 如果第 1 个蛋白与第 2 个蛋白有相互作用, 那么 2 个非荧光片段结合形成 1 个发光复合体, 即发生 BIFC; 如果第 3 个蛋白与第 4 个蛋白有相互作用, 那么两个非荧光片段结合形成 1 个荧光复合体, 即发生 BIFC; 如果这 4 个蛋白之间存在相互作用, 当加入催化底物后, 酶反应提供的能量会转移给荧光蛋白使其发出荧光, 即发生 FRET

2.2.2 信号转导网络蛋白复合体 许多蛋白质能够与不同的靶分子相互作用, 这些相互作用整合起来形成了一个复杂的联系网络, 这个网络中相互作用的蛋白的信号能够通过这个网络传递下去。FRET-PCAs 的联合应用能够可视化这个体系中每个蛋白质之间的相互作用, 从而有利于了解特定的蛋白质间的相互作用与调节其定位和信号效率之间的关系。这种联合技术已经被实时检测了多种蛋白质之间相互作用, 包括胞质中可扩散的成分以及膜受体, 通过对细胞质和细胞核转导成分之间相互作用的研究来追踪不同细胞器间进行的信号转导。用 BiFC-BRET 已检测到 β_2 AR、G 蛋白的 γ_2 亚基以及腺苷酸环化酶能形成一个信号复合体^[14]。除此之外, 还可以采用 BiFC 与 FRET 或 BRET 联合技术来研究其他 GPCRs 的信号转导网络的时空动态、信号蛋白的空间定位和调控体系的机制(图 4)。资料显示, GPCRs 不仅能以单体的形式存在, 还可以以二聚体甚至是高阶寡聚体的形式存在, 这些寡聚体有不同于单体的特异功能特征, 包括配体识别、脱敏、内化、再循环、合成及运输等^[15], 本实验室将用该结合技术来研究 APJ-KOR 异源二聚体与细胞内 G 蛋白、GRKs 和 β -arrestin 之间的相互作用^[16], 这些相互作用有助于探寻相关疾病治疗的新突破点及新药开发。

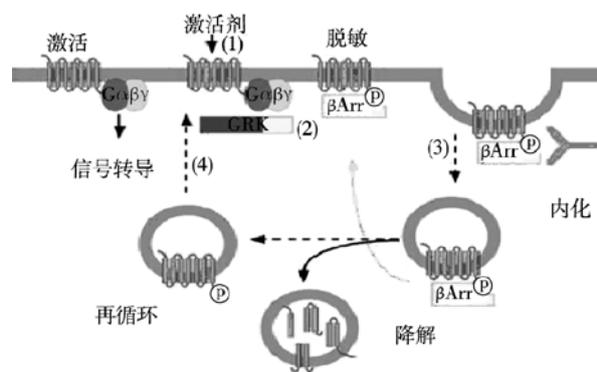


图 4 G 蛋白偶联受体的脱敏、内化和再循环的过程

1) 激动剂与受体结合; 2) GRKs 介导 GPCR 发生磷酸化, β -抑制蛋白与磷酸化的受体结合, 受体与 G 蛋白异聚体解耦联, 即发生了脱敏反应; 3) 通过网格蛋白有被小窝而发生受体内化和内吞; 4) 受体重返胞膜(复敏)。

3 展望

基于荧光和发光新型技术的相互结合已被成功的应用于活细胞 GPCRs 高阶寡聚体以及信号

转导网络中蛋白复合体的研究。虽然这些技术仍存在缺陷(不能在原生环境中直接进行检测),但这些技术在不断得到改善和拓展。例如为了证实 GPCRs 寡聚体在原生环境中的存在,已经开发出一种新型 TR-FRET 方法,该方法的核心是被荧光配体标记的受体。该方法已被成功运用到原生组织中并成功地展示出乳腺中催产素受体寡聚体的存在^[17]。LA Hu 等人在此基础上以人类 C5a 受体为模型开发出一种研究 GPCR-配体之间连接的新型 TR-FRET 方法,以 TR-FRET 为基础的方法是一种非放射性、更快速并且具有较高的灵敏性,这种测定法能够被简单地应用于高通量的药物筛选^[18]。经过改善以后的技术的结合可用于更深层次的研究,如将 BRET-TRFRET 结合起来,发现蛋白酶激活受体 1 能与 G α 1、 β -arrestin 1 而非 G α 1 形成预组装复合物^[19]。因此,随着技术的拓展和开发,他们将是很研究领域中有力的生物技术,例如用于药物发现,这为、癌症、糖尿病、心血管疾病的治疗带来新的曙光。

参考文献:

[1] Khan SH, Ahmad F, Ahmad N, et al. Protein-protein interactions: principles, techniques, and their potential role in new drug development. *J Biomol Struct Dyn*, 2011, 28(6): 929-938.

[2] 李雅林,白波,陈京. 生物发光共振能量转移技术及其应用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 2(12): 1077-1082.

[3] 蔡欣,陈京,白波. G 蛋白偶联受体高阶聚化和信号转导中蛋白复合体的时空动态检测[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 8-12.

[4] David WP, Gert-Jan K. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(9): 407-414.

[5] SY Khan, NJ McLaughlin, MR Kelher, et al. Lysophosphatidylcholines Activate G2a Inducing G(Alphai)-/G(Alphaq/-Ca(2)(+) Flux, G(Betagama)-Hck Activation and Clathrin/Beta-Arrestin-1/Grk6 Recruitment. in Pmns[J]. *Biochem J*, 2010, 432(1): 35-45.

[6] Yoshitake K, S Waki, H Ueda. Dimerization-based homogeneous fluorosensor proteins for the detection of specific dsDNA[J]. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2007, (51): 307-308.

[7] Breton B, Lagacé M, Bouvier M. Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the alpha2A-adrenergic receptor, Galphai1beta1gamma2, and GRK2 [J]. *FASEB J*, 2010, 24(12): 4733-4743.

[8] P Carriba, G Navarro, F Ciruela, et al. Detection of Heteromerization of More Than Two Proteins by Sequential BRET-FRET[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(8): 727-733.

[9] Lopez-Gimenez JF, Canals M, Pediani JD, et al. The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer; effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function[J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(4): 1015-1029.

[10] B Breton, M Lagace, M Bouvier. Combining Resonance Energy Transfer Methods Reveals a Complex between the Alpha2a-Adrenergic Receptor, Galphai1beta1gamma2, and Grk2 [J]. *FASEB J*, 2010, 24(12): 4733-4743.

[11] Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(11): 1693-1702.

[12] YJ Shyu, CD Suarez, CD Hu. Visualization of Ap-1 Nf-Kap-pab Ternary Complexes in Living Cells by Using a Bifc-Based FRET[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(1): 151-156.

[13] RV Rebois, M Robitaille, D Petrin, et al. Combining Protein Complementation Assays with Resonance Energy Transfer to Detect Multipartner Protein Complexes in Living Cells[J]. *Methods*, 2008, 45(3): 214-218.

[14] Cai X, Chen J, Bai B. Exploring the specific role of GPCRs dimerization in drug discovery[J]. *J Chin Pharmaceutical Sci*, 2011, 535-541.

[15] 蔡欣,陈京,张敬美,等. G 蛋白偶联受体激酶在细胞迁移和细胞信号转导中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27: 1438-1444.

[16] L Albizu, M Cottet, M Kralikova, et al. Time-Resolved FRET between GPCR Ligands Reveals Oligomers in Native Tissues [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(8): 587-594.

[17] LA Hu, T Zhou, BD Hamman, et al. A Homogeneous G Protein-Coupled Receptor Ligand Binding Assay Based on Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2008, 6(4): 543-550.

[18] MA Ayoub, E Trinquet, KD Pflieger, et al. Differential Association Modes of the Thrombin Receptor Par1 with Galphai1, Galpha12, and Beta-Arrestin 1[J]. *FASEB J*, 2010, 24(9): 3522-3535.

(收稿日期 2012-01-05)