



诱导同源蛋白质二聚化的方法*

郭俊霞^{1,3)} 刘 森^{1,2)**}⁽¹⁾ 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 工业发酵省部共建协同创新中心, 武汉 430068;⁽²⁾ 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 发酵工程教育部重点实验室, 武汉 430068;⁽³⁾ 湖北微生元生物科技有限公司, 鄂州 436006)

摘要 同源蛋白质二聚化是一种普遍的现象, 在许多生物过程中发挥着关键作用。多数细胞事件, 如信号转导、转录因子募集、酶激活, 甚至致病途径, 都通过同源蛋白质-蛋白质相互作用受到显著调节。调控同源蛋白质二聚化过程和了解其分子机制对于生物医学应用以及剖析复杂的生物调控网络至关重要。邻近效应或分子的物理接近效应是生物过程中必不可少的调节因素, 可以通过诱导二聚化方法来控制。基于临近诱导的化学诱导二聚化 (chemically induced dimerization, CID) 系统与光诱导二聚化 (light induced dimerization, LID) 系统为调节二聚化蛋白质的功能提供了强大的工具, 并得到逐步发展。近年来, 金属离子、核酸和分子主客体系统被提出作为正交控制同源蛋白质二聚化的新方法。本综述阐述了通过 CID 系统、LID 系统以及超分子化学的手段诱导同源蛋白质二聚化的方法与应用, 以期今后同源蛋白质二聚化的应用发展提供一些参考与思路。

关键词 蛋白质-蛋白质相互作用, 邻近诱导, 同源二聚化, 化学诱导二聚化, 光诱导二聚化

中图分类号 Q816, 819, Q6-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0106

二聚体蛋白质是自然界中最简单且迄今为止最丰富的蛋白质组装形式^[1]。蛋白质二聚化是蛋白质相互作用形成功能组装的关键生物学过程, 可以赋予蛋白质多种不同的结构和功能优势, 包括提高稳定性、调节活性和增加复杂性^[2]。蛋白质二聚化包括同源蛋白质二聚化与异源蛋白质二聚化。其中, 同源蛋白质二聚化是一种更加常见的现象, 因为单个蛋白质自组装的内在倾向性很高^[3]。

蛋白质二聚化可以调节酶激活、信号转导以及致病途径等一系列生物学过程^[4]。蛋白质二聚化的调控是生物体在自然环境内在或外在因素刺激下生长发育的重要过程, 因此, 调控蛋白质二聚化过程和了解其分子机制代表了研究的前沿, 并为生物医学应用以及剖析复杂的生物调控网络提供了重要信息。

邻近效应或分子的物理接近效应是生物学中普遍存在的调节机制, 可以通过诱导二聚化方法来控制。尽管新工具不断涌现, 但诱导二聚化的基本原理保持不变: 在化学物质或光的刺激下, 两种蛋白

质被人为地拉近距离。与传统的遗传扰动相比, 诱导二聚化方法的操作具有优越的时空分辨率, 因此更适合研究动力学和时空受限过程^[5]。诱导二聚化系统主要根据其二聚化触发因素而有所不同。化学诱导二聚化 (chemically induced dimerization, CID) 系统基于与两个相同蛋白质 (同源二聚化) 或两个不同蛋白质 (异源二聚化) 相互作用的小分子^[6]。光诱导二聚化系统 (light induced dimerization, LID) 采用光敏蛋白, 在光照下发生构象变化, 从而诱导蛋白质相互作用^[7]。此外, 近年来还出现了金属离子、核酸和分子主客体系统等超分子化学控制蛋白质二聚化的方法。所有这些物理或化学元素的作用是将二聚体蛋白结合在一起诱导二聚化, 从而激活或抑制生物事件。与调控异源蛋白质二聚化应用相关的研究参见相关综

* 国家自然科学基金 (31971150), 湖北省创新群体项目 (2024AFA014) 和湖北省杰出青年基金 (2019CFA069) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 027-59590100, E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

收稿日期: 2024-03-15, 接受日期: 2024-05-30

述 [8-9], 本文将围绕通过 CID 系统、LID 系统以及最近出现的超分子化学的手段诱导同源蛋白质二聚化的方法与应用进行综述。诱导同源蛋白质二聚化方法的原理如图 1 所示。

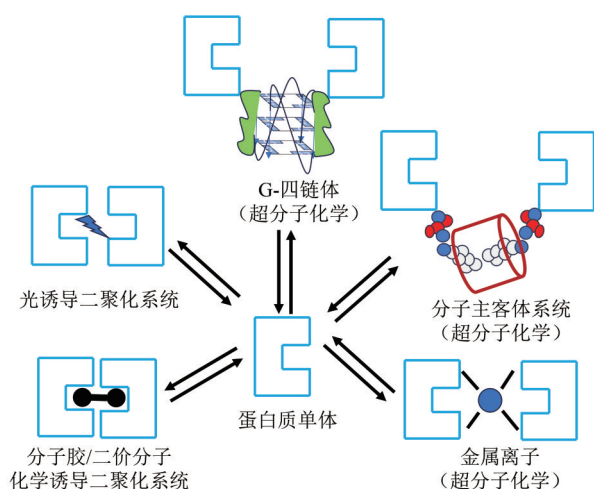


Fig. 1 Principle diagram of inducing homologous protein dimerization method

图1 诱导同源蛋白质二聚化方法原理图

1 化学诱导二聚化 (CID)

CID 的概念是由 Belshawl 等^[10] 提出的, 随后, 概念类似的化学诱导同源二聚体系统被提出^[11]。CID 的基本原理是一个小分子控制一对蛋白质或结构域的二聚化, 同时结合两个蛋白质并使它们靠近^[12]。CID 系统中的小分子与靶蛋白形成三元复合物, 可以结合到各种位点, 包括“热点”与“变构位点”, 小分子通过调节蛋白质接近度而发挥作用。小分子诱导二聚化的通用作用机制为: 结合和共定位两个生物大分子结合伴侣以产生二聚体复合物; 在具有生物学意义的方向上排列结合伴侣; 协调广泛的分子间相互作用网络^[13]。按其特征分类, 诱导二聚化的小分子有两类: 分子胶和二价分子^[14]。分子胶是指依赖目标蛋白的二级结构特征控制蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 的单价小分子, 没有明显的连接体, 而二价分子具有三个组成部分, 包括两个官能团和一个连接体。同源 CID 系统中小分子的相关信息见表 1。

1.1 分子胶诱导同源蛋白质二聚化

早在 1993 年, Spencer 等^[15] 指出, 大环天然

产物具有一种独特的功能, 可以充当分子胶, 将两种彼此之间几乎没有亲和力或亲和力很弱的蛋白质结合在一起。在 2000 年之前, 就出现了利用大环天然产物诱导同源蛋白质二聚化的例子, FK506 合成二聚体-FK1012 可以促进 FKBP12 同源二聚化, 或者环孢菌素合成二聚体-(CsA)₂ 可以诱导亲环蛋白质二聚化^[16]。此外, 在同一时期非大环天然产物也作为分子胶被合理使用, Farrar 等^[17] 使用天然产物香豆毒素形成 Raf-1-GyrB 融合体的同源二聚体。而之后用于诱导同源蛋白质二聚化分子胶的发现, 大多具有偶然性, 或者通过大量的筛选并经过一系列验证才得以被发现。

2012 年, Graves 等^[18] 通过小分子库筛选, 发现小分子 RO-2443 对 P53-MDMX 和 P53-MDM2 相互作用表现出相似的抑制活性, MDM2 和 MDMX 是 P53 肿瘤抑制因子的负调节因子, 是有希望的癌症治疗靶点^[19]。在检查 RO-2443 和 MDMX 之间相互作用的机理研究中, 核磁共振光谱、静态光散射和动力学分析的结果表明, RO-2443 可能充当分子胶来诱导 MDMX 二聚化。分辨率为 1.8 Å 的 MDMX/RO-2443 共晶证实了这一预测, RO-2443 占据 MDMX 的 P53 结合口袋形成二聚体并嵌入中央空腔, 其中两个 RO-2443 分子被两个蛋白质的相互作用包围, 四个单体排列成一对二聚体。RO-2443 的两个氯吡啶基团和相应蛋白质单体的 Tyr66 残基之间形成了广泛的芳香堆积相互作用, 这是聚合物形成的关键相互作用。此外, RO-2443 与 Gln71 残基形成两个氢键相互作用。由于分子胶将两个 MDMX 二聚体拉得更近, ^aLys93 (a 链) 残基与 ^bGlu70 (b 链) 残基相互作用, ^aGlu58 和 ^bGlu58 形成氢键相互作用, 从而稳定二聚体。

2019 年, Wojtaszek 等^[20] 使用特殊的酶联免疫吸附测定筛选了大约 10 000 种结构多样的化合物, 发现化合物 JH-RE06 充当分子胶的角色, 有效阻碍 REV1-REV7 相互作用。REV1 与 REV7 是诱变性跨病变合成 (mutagenic translesion synthesis, TLS) 过程中的重要蛋白质, TLS 可导致化疗耐药, 因此, 靶向 TLS 是使肿瘤对化疗药物敏感的有效方法^[21]。共晶结构研究表明, JH-RE-06 诱导 REV1 二聚化。在嵌合 REV1 碳端结构域 (chimeric REV1 C-terminal domain, cREV1 CTD) 二聚体中, 两个 REV7 结合口袋彼此面对, 形成用于 JH-RE-06 结合的深腔。单体的碳端结构域 (CTD) 由 JH-RE-06 的酰基链和一个大的 1,4-二氢喹啉酮基团引

出, cREV1 CTD 和 JH-RE-06 之间存在大量的疏水相互作用。^aGln105 和 ^bSer114 的侧链与 JH-RE06 的 1,4-二氢喹啉酮部分的氢键受体基团形成直接极性相互作用。两个单体的 C 端尾部相互配对, 形成反向平行 β 折叠片层, 用于结合 JH-RE-06。具体而言, ^bLys69、^bGlu72 和 ^bAsp75 残基与 ^aGlu75、^aTyr112 和 ^aThr115 形成氢键以稳定 cREV1 CTD 二聚体。JH-RE-06 诱导二聚体的形成屏蔽了 REV7 结合表面, 从而阻断了 REV7 和 REV1 CTD 之间的相互作用。进一步的体外和体内药效学研究表明, JH-RE-06 与顺铂联用增强了顺铂对多种细胞系的毒性, 并减少了小鼠异种移植人黑色素瘤的体积^[22]。

2017 年, Zak 等^[23] 开展了百时美施贵宝公司 (BMS) 在其专利中公开的几种程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) /程序性死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 非肽 PPI 抑制剂的机制研究, 发现小分子 BMS-202 充当分子胶的角色, 可以诱导并稳定 PD-L1 同源二聚体的形成, 从而阻断 PD-1/PD-L1 相互作用。PD-1/PD-L1 是关键免疫检查点, 其相互作用的调节代表了肿瘤免疫治疗的重要策略。核磁共振实验表明, BMS-202 直接与其靶蛋白 PD-L1 结合, 但不结合 PD-1。此外, 结果还表明, BMS-202 诱导形成约 30 ku 的复合物, 这与 PD-L1 和 BMS-202 的 2:1 复合物的质量一致。进一步的晶体结构分析证实, BMS-202 作为分子胶诱导 PD-L1 的二聚化。^aAsp122 和 ^aLys124 与 BMS-202 形成氢键, ^bGlu58、^bASP61、^bAsp122 和 ^bTyr123 残基与 ^aTyr56、^aGlu58、^aAsp61 和 ^aArg113 形成氢键。BMS-202 的联苯环和 ^aTyr56 残基之间存在 p-p 堆积相互作用, 将 BMS-202 分子和 PD-L1 二聚体锁定到位, 生成稳定的三元复合物。这些发现促成了 Muszak 等^[24]、Liu 等^[25]、Ouyang 等^[26]、Wang 等^[27] 和 Song 等^[28] 最近报道的 PD-L1 二聚体分子胶的发现。Zhang 等^[29] 也利用 BMS-202 作为模式分子, 发现了一系列靶向 PD1/PD-L1 相互作用的新型抑制剂。

2006 年, Ladenson 等^[30] 从美洲骆驼中分离出一种咖啡因特异性、仅重链的抗体片段 (anti-caffeine VHH, Ac-VHH)。该抗体片段具有三个互补决定区 (complementary determinant region, CDR) 界面, 可以用于控制合成细菌受体的激活以及用于以咖啡因依赖性方式控制糖尿病模型动物的血糖。他们通过等温滴定量热法以及体积排阻色

谱法确定了 Ac-VHH 与咖啡因的化学计量比为 2:1。直至 2019 年, 通过分辨率为 2Å 的咖啡因/Ac-VHH 共晶结构才确定了其结构基础: 每个二聚体结合埋藏在界面处的一个咖啡因分子, 即咖啡因作为分子胶诱导 Ac-VHH 二聚化。在 Ac-VHH 中, 咖啡因结合由来自两个不同 VHH 分子的高度刚性的 CDR1 和 CDR3 形成的空腔中, 并触发它们的二聚化^[31]。

多胺是天然存在的小聚阳离子烷基胺, 在许多生物学过程中发挥重要作用, 包括胚胎发育、细胞周期以及细胞增殖、分化和凋亡^[32]。鸟氨酸脱羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC) 是多胺合成途径中的第一个限速酶, ODC 活性和多胺的细胞水平对细胞增殖以及肿瘤疾病的发生和发展至关重要, 因而 ODC 已被公认为是一种致癌酶, 是一种真正的药物靶点。因此, 多胺通路的 ODC 抑制剂和负调节因子可能有益于治疗许多癌症。此外, 在体内, ODC 的活性还受到蛋白抑制剂鸟氨酸脱羧酶抗酶 1 (ornithine decarboxylase enzyme 1, OAZ1) 的调节。本课题组通过结合阳性筛选与阴性筛选建立了计算流程, 并使用该计算流程筛选了可能抑制 ODC 活性、阻断 ODC-OAZ1 相互作用并增强 ODC 非功能性二聚化的多用途配体^[33]。通过结合不同的实验测定, 确定了三种多用途 ODC 抑制剂 ODC-MPI-1、ODC-MPI-2 与 ODC-MPI-3。其中, 我们证明了 ODC-MPI-1 是一种有前途的候选药物, 进而试图对其与 ODC 相互作用的结合模式进行更深入的探究。对接模型结果表明, ODC-MPI-1 与 Cys360 具有直接相互作用, 突变后, ODC-C360A 的活性不能被 ODC-MPI-1 抑制, 间接证实 ODC-MPI-1 应该与 ODC 的这个底物结合口袋结合。虽然晶体结构暂未获得, 但 ODC-MPI-1 可能是潜在的分子胶, 通过诱导 ODC 同源蛋白质二聚化进而发挥其抑制作用。ODC-MPI-1 可能具有更高的应用价值, 因为它不仅靶向 ODC 二聚体界面从而抑制其酶催化活性, 还抑制了 ODC-OAZ1 的 PPI 相互作用。这种多用途配体抑制剂可能产生较少的反馈补偿, 进而产生更加有效的治疗效果, 具有更广阔的临床应用前景。

1.2 二价分子诱导同源蛋白质二聚化

2000 年, 不同于传统 CID 系统的基于甲氨蝶呤 (MTX) 的二聚化系统在体外被开发研究^[34]。叶酸类似物 (BisMTX) 与二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 结合非常紧密,

抑制了这种关键酶在核苷酸生物合成中的功能。Kopytek 等^[34]利用 MTX-DHFR 相互作用的广泛结构信息,选择了对 MTX-DHFR 结合非必需的 MTX 区域,并通过适当长度的接头将其连接到第二个 MTX 分子上的同一位点。BisMTX 能够引起在体外纯化的 DHFR 单体二聚化。

2007 年,同源二聚体系统的概念被提出。人非胰腺磷脂酶 A2 (non pancreatic phospholipase A2, PLA2) 是一种参与花生四烯酸和溶血磷脂代谢的酶,与炎症过程有关。酶的平坦 *i-face* 与磷脂双分子层紧密相互作用。Zhou 等^[35]使用已知的 PLA2 *i-face* 结合吡啶抑制剂,构建了具有不同接头的同双功能吡啶配体,可以在体外使纯化的酶发生二聚化。其中效果较好的吡啶配体抑制 PLA2 活性的效果比单体吡啶高 5 倍,不仅有望作为因 PLA2 过度表达引起的类风湿性关节炎的治疗剂,而且有望作为一种新型 CID 系统。

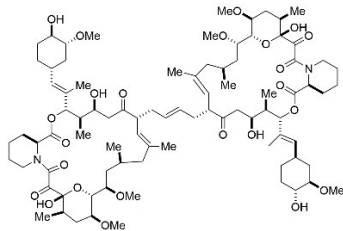
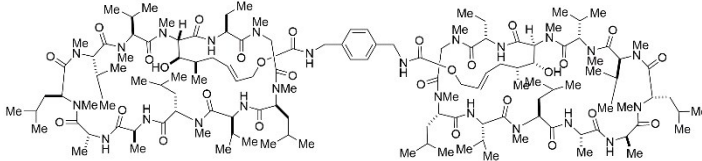
2016 年, Tanaka 等^[36]和 Waring 等^[37]报告了溴和末端结构域 (Bromo and extraterminal domain, BET) 蛋白 Brd2、Brd3 和 Brd4 的二价抑制剂。大多数 BET 抑制剂 (例如,经典的 JQ1 和 IBET-762) 通过靶向溴结构域单价结合 BET 蛋白。二价分子的应用对于靶向 BET 蛋白来说是一个有吸引力的机会,因为所有 BET 蛋白在其氮端区域都包含两个不同的溴结构域,称为 BD1 和 BD2。MT 和 BiBETs 被发现在分子内结合单个 BET 蛋白的两个结构域。共晶结构和相关生物物理学研究证明,抑

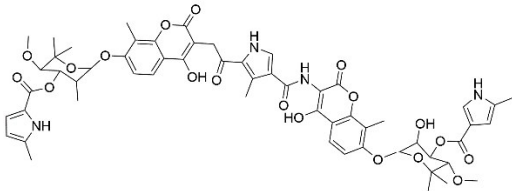
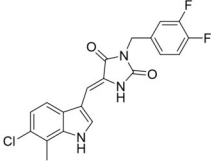
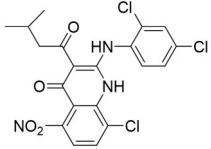
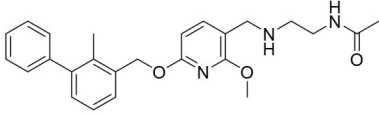
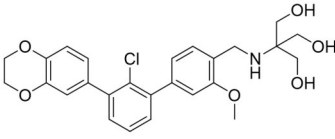
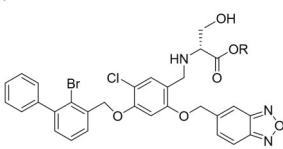
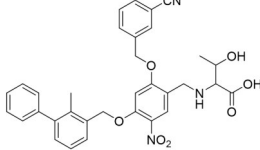
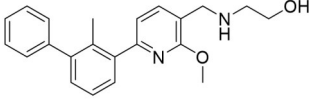
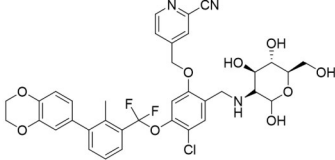
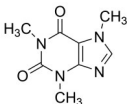
制剂连接两个溴结构域并诱导广泛的分子间 PPI。在 MT1 中,两个 JQ1 分子使用七个乙二醇单元的连接体长度 (PEG-7 连接体) 连接在一起。研究发现, MT1 在阻止 Brd4 与细胞染色质结合方面的效力比相应的单价抑制剂 JQ1 强 100 倍。BiBET 最初是为了下调雄激素受体信号传导而开发的,后来发现它可以同时参与 BET 蛋白的两个溴结构域。用这些二价化合物处理的细胞显示出对细胞生长的抑制,其方式与对 BET 抑制的敏感性一致,并且效力显著增强,与强亲和力效应一致。

Maniaci 等^[38]于 2017 年将 CID 和 PROTAC 的概念结合,首先表明,可以使用双功能分子 “homo-PROTAC” 将 E3 泛素连接酶二聚化,作为诱导细胞中 E3 连接酶降解的策略。双功能分子由相同的 VHL (von Hippel-Lindau) 配体 (VH032 或 VH298) 构建,通过 PEG 连接体以对称或不对称方式连接,以诱导 CRL2^{VHL} (一种 E3 连接酶) 二聚化。鉴定出的最佳降解剂是对称同源蛋白质水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTAC) CM11,在体外对 VHL 二聚表现出高协同性,与亚化学计量的作用模式一致。这项工作证明, CM11 是一种快速、有效的 PROTAC,可在不同细胞系中诱导 VHL 深度且持久的降解^[39]。随后, Steinebach 等^[40]也应用了相同的模式,设计了 CRL4^{CRBN} 连接酶的 homo-PROTAC,使化合物 15a 成为最活跃的 CRBN 降解剂。

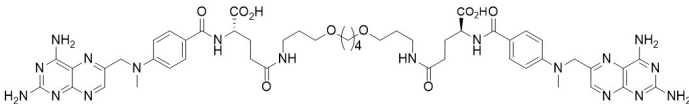
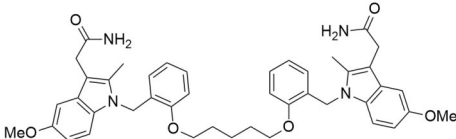
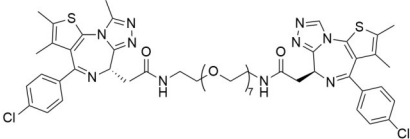
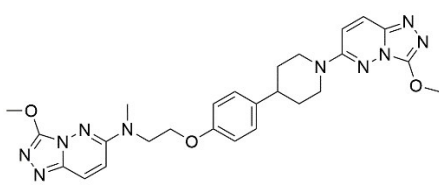
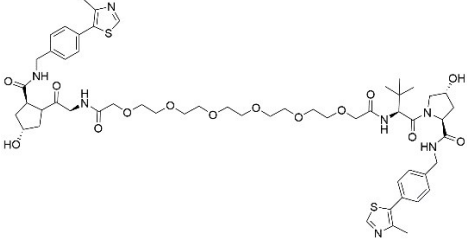
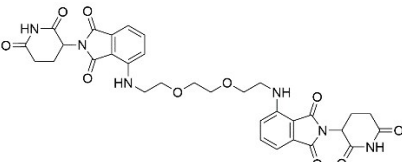
Table 1 Small molecule information in homologous CID systems

表1 同源CID系统中的小分子信息

小分子	结构式	目标蛋白	参考文献
FK1012		FK506结合蛋白	[16]
(CsA) ₂		环孢素A结合蛋白	[16]

续表1			
小分子	结构式	目标蛋白	参考文献
香豆霉素		DNA旋转酶B	[17]
RO-2443		MDMX	[18]
JH-RE-06		跨病变成聚合酶	[20]
BMS-202		程序性死亡受体配体-1	[23]
Compound 1			[24]
Compound 2			[25]
Compound 3			[26]
Compound 4			[27]
Compound 5			[28]
咖啡因		AcVHH	[31]

续表1

小分子	结构式	目标蛋白	参考文献
BisMTX		二氢叶酸还原酶	[34]
吡啶类似物		脂蛋白相关磷脂酶A2	[35]
MT1		BrD4 ^{BD1}	[36]
Bi-BET			[37]
CM11		VHL	[39]
Compound 15a		CRBN	[41]

MDMX: 鼠双微体蛋白X (murine double minute X); AcVHH: 抗咖啡因重链抗体片段 (anti-caffeine-heavy-chain-only antibody fragment (VHH)); BrD4^{BD1}: BrD4蛋白的第一个溴结构域 (the first bromodomain of BrD4); VHL: 抑癌基因蛋白 (von Hippel-Lindau); CRBN: cereblon, 是E3连接酶泛素复合物中的一种底物识别蛋白。

2 光诱导二聚化 (LID)

LID采用光敏蛋白，在光照下发生构象变化，从而诱导蛋白质相互作用，LID系统中使用的光敏蛋白主要从光合生物中获得^[42]。源自植物和微生物的多种光敏蛋白可以进行光诱导的同源相互作用，依靠LID系统，可用于研究多种生物学过程，包括细胞信号转导、微生物合成以及 biomedical 应用等。本文重点关注三种类型的光敏蛋白：光-氧-电

压 (light-oxygen-voltage, LOV) 结构域蛋白、隐花色素 2 (cryptochrome 2, CRY2) 和光敏色素，这些光敏蛋白都已广泛用于控制信号转导途径和其他生物过程^[43-44]。本文将介绍同源LID系统及部分应用，LID系统的具体信息见表2。

2.1 LOV结构域蛋白

LOV 结构域是一种小型 (~14 ku) 光敏蛋白，广泛存在于植物、细菌和真菌的光感受器中^[45]。一旦被蓝光激活，LOV 结构域的C端J α 螺旋会在

几秒钟内与 PER-ARNT-SIM 核心域脱离, 构象发生变化导致各种信号输出^[46]。由于其体积小、普遍存在的相关生色团辅因子以及作用机制的多样性, LOV 结构域家族的光感受器为大多数目前可用的 LID 系统做出了贡献。例如, 蓝光可以诱导来自无隔藻 (*Vaucheria frigida*) 金黄色素 1 的 LOV 结构域 (LOV domain of aureochromel from *Vaucheria frigida*, VFAU1-LOV) 二聚化^[47] (图 2)。基于燕麦 LOV2 结构域 (AsLOV2) 及其接头蛋白 SspB 的改良光诱导二聚体 (iLID) 是一对光学异二聚体。最近, iLID/SspB 对被设计为 iLID+tdSspB 系统, 可以与 SspB 串联二聚体结构发生同源相互作用^[48] (图 2)。本课题组也利用 LOV2 结构域设计了可光调控的同源二聚体 KaiA 蛋白 (一种蓝藻生物钟蛋白), 并使用该融合蛋白调节 KaiC (一种蓝藻生物钟蛋白) 的磷酸化与去磷酸化^[49]。

来自滨海红杆菌的 EL222 光感受器蛋白和来自真菌链孢霉菌的光敏蛋白 Vivid (VVD) 光感受器蛋白都是 LOV 结构域光感受器家族的成员, 它们对蓝光刺激有反应, 并且它们具有类似的光诱导反应, 涉及暴露相互作用表面以进行同源二聚化。由于许多转录因子以二聚体的形式起作用, EL222 和 VVD 被广泛用于通过同源二聚化调节基因转录^[50]。

EL222 是一种自然进化的转录因子, 包含一个 N 端 LOV 光敏结构域和一个 C 端螺旋-转角-螺旋 (HTH) DNA 结合结构域。在黑暗条件下, EL222 在 4 α 螺旋基序和 LOV 表面之间表现出抑制性接触, 从而阻止 DNA 结合^[51]。EL222 在基因调控中的应用只需要将 EL222 结合基序掺入所选启动子中, 因为它具有作为转录激活子的天然功能。通过调整启动子区域 EL222 结合基序的位置使其远离或与 RNA 聚合酶结合序列重叠, 可以将启动子设计为诱导型或抑制型。由于 EL222 光遗传学系统的简单性和紧凑性, 诱导型和抑制型 EL222 系统甚至可以在单细胞内并行表达, 以实现双向基因调控。EL222 介导的基因表达已在广泛的应用中建立。鞭毛旋转调节因子 (CheZ) 的受控表达会导致大肠杆菌产生负趋光性^[52], 而细菌分裂和细胞形状则因控制细菌细胞分裂中的关键因子 (FtsZ) 的表达而受到干扰^[53]。

Vivid (VVD) 是来自真菌的最小的含有 LOV 的蛋白质, 其工程变体 (Magnets) 已用于控制蛋白质二聚化。VVD 的结构由 N 端 α 螺旋帽组成,

在暗适应状态下与 LOV 结构域的核心对接。与 EL222 类似, 光诱导的结构重新取向消除了 LOV 核心的空间位阻, 从而暴露了两个 VVD 之间用于 LOV-LOV 二聚化的界面^[54]。为了使用 VVD, 每个 VVD 都与相同的目标蛋白 (protein of interest, POI) 融合, 以便能够重组为同源二聚体, 并以蓝光特异性方式激活蛋白质功能。基于这一原理, 构建了一个非常强大的光调控基因表达系统。此外, VVD 还可用于转化细胞中的非光响应性同源二聚体, 通过用 VVD 替换其天然二聚化结构域以响应蓝光。VVD 相关工程变体用于控制同源蛋白质二聚化的其他应用见表 2。

2.2 隐花色素 2 (CRY2)

LID 系统中经常使用的一种光依赖性成分是拟南芥光感受器 CRY2。CRY2 的光响应性依赖于通过黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 发色团发生的光化学反应, 该发色团通过构象变化促进同源蛋白质相互作用, 并且不需要添加外源辅因子^[55] (图 2)。然而, 各种证据表明, 野生型 CRY2 表现出较差的聚集效果, 这依赖于 CRY2 蛋白的细胞内浓度和标签蛋白的类型。为了提高 CRY2 的聚集效率和潜在应用, 开发了新的基于 CRY2 的光遗传模块。带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的 CRY2 E490G 突变体, 命名为 CRY2olig, 在光照下显示出快速且可逆的聚集能力和蛋白质功能的控制^[56]。另一种新的聚类系统 CRY2clust 是通过在 CRY2 的碳端标记一个新发现的短肽而开发的, 细胞内 CRY2 浓度受该短肽的影响较小, 即使在低表达水平下, CRY2clust 也能快速有效地聚集^[57]。CRY2clust 在控制蛋白激酶、Raf1 和其他信号蛋白的活性方面显示出广泛应用的巨大潜力。

2.3 光敏色素

基于 LOV 或 CRY 的系统依赖于蓝光敏感的光感受器, 而光敏色素能够感知红光和远红光, 并控制植物和微生物发育的许多功能。光敏色素超家族的光敏蛋白感知红光至近红外 (near infrared, NIR) 范围 (620~800 nm) 的光子, 具有更高的光穿透深度。植物光敏色素和蓝细菌光敏色素都利用藻蓝蛋白 (phycocyanobilin, PCB) 作为发色团, 这在非光合生物中不是天然可用的; 而细菌光敏色素利用胆绿素 Ix α (BV), 可以从哺乳动物细胞中的血红素合成^[58]。不同来源的光敏色素构成了头对头的二聚体结构, 例如来自集胞藻属的蓝藻光敏色素 1 (Cph1) 在红光下发生二聚化, 并在辅因子

藻蓝蛋白存在下在远红光下发生单体化（图2）。Reichhart等^[59]通过识别和调整Cph1的感觉结构域，介绍了一种红光诱导的蛋白质同源二聚化方法，这种光诱导的二聚体组装系统可能直接或者通过多个光受体结构域掺入后形成更大的复合物来调节细胞黏附、基因转录或细胞骨架等一系列细胞过程。

耐辐射球菌的细菌光敏色素（DrBphP）形成

头对头平行二聚体，可以在远红光或近红外光照射下在毫秒之内可逆地转换其构象，无需添加任何外源辅因子。DrBphP二聚体的C端组氨酸激酶结构域在红光（660 nm）照射后以约35 Å的间隙分隔。它们在NIR（740~780 nm）照明或黑暗中相互接近，从而实现融合到C端蛋白质的同源相互作用^[60]（图2）。

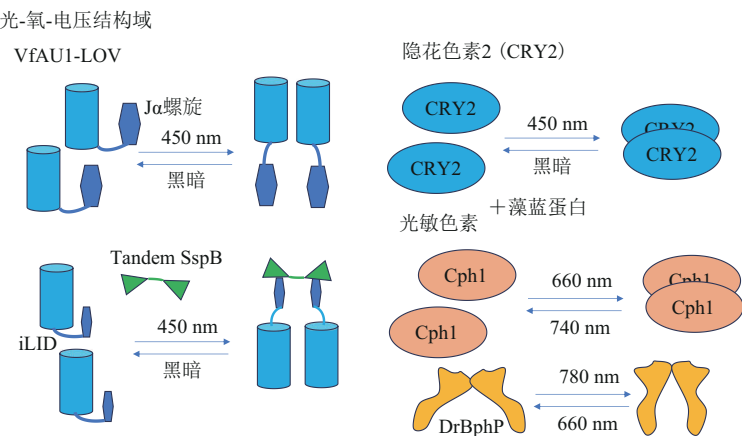


Fig. 2 Schematic diagram of photo induced homodimeric interactions between LOV domains, cryptochrome 2, and phytochromes

图2 LOV结构域、隐花色素2、光敏色素的光诱导同源二聚相互作用示意图

Table 2 LID system inducing homologous protein dimerization
表2 诱导同源蛋白质二聚化的LID系统

光诱导二聚化系统	发色团	激发/逆转波长/nm	激发/逆转时间	参考文献
VfAu1-LOV	FMN	450/黑暗	分	[47]
iLID-SspB	FMN	450/黑暗	秒	[48]
EL222	FMN	450/黑暗	秒	[50]
CRY2	FAD	450/黑暗	秒~分	[55]
CRY2olig	FAD	450/黑暗	秒~分	[56]
CRY2clust	FAD	450/黑暗	秒~分	[57]
Cph1	PCB	630/647	秒~分	[59]
DrBphp	胆绿素	660/780	毫秒~分	[60]
BLADE	FAD	450/黑暗	时	[61]
Light Off, Inverted-Light Off systems	FAD	450/黑暗	-	[62]
VVD	FMN, FAD	450/黑暗	分~时	[63]
yLightOn	FAD	450/黑暗	时	[64]
paT7P-1	FAD	450/黑暗	-	[65]
YtvA	FMN, FAD	450/黑暗	分~时	[66]
Opto-Cre-VVD/Cre-Mag/Flp-VVD/Flp-Mag	FAD	450/黑暗	时	[67]

FMN: 黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide); FAD: 黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide); PCB: 藻蓝蛋白。

3 超分子化学诱导同源蛋白质二聚化

目前用于诱导同源蛋白质二聚化的强有力化学方法是使用CID系统。此外, 金属离子、核酸和分子主客体系统等超分子化学方法的应用也得到了探索。所有这些化学元素通过将两个蛋白质聚集在一起诱导二聚化, 导致生物事件的激活或抑制。

3.1 金属离子诱导同源蛋白质二聚化

Salgado等^[68]开发了一种新的方法, 金属定向蛋白自组装(MDPSA), 它利用金属-配体相互作用的强度、方向性和选择性来控制蛋白质二聚化, 在埋藏的金属离子中心周围生成了新的、进化上原始的蛋白质-蛋白质界面。例如, Salgado等^[68]使用四螺旋束血红蛋白细胞色素 cb_{562} 作为支架蛋白, 应用金属导向的组装来设计同源蛋白, 命名为MBPC1(一种模式金属蛋白)的二聚化。在细胞色素 cb_{562} 的螺旋表面设计了两个*i/i+4* bis/His基序, 产生了一种称为MBPC1的变体。添加 Cu^{2+} 导致溶液中MBPC1的二聚化, 铜离子结合蛋白的晶体结构揭示了由两个具有方形平面几何形状 Cu^{2+} : His₄位点连接在一起的反平行二聚体^[69]。此外, 金属导向的同源蛋白二聚化反应扩展到包括非天然配体的使用^[70]。细胞色素 cb_{562} 变体被设计为具有单个组氨酸残基和以*i/i+7*排列共价连接到半胱氨酸残基的羟基喹啉螯合物。添加半摩尔当量的二价金属离子 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 导致在溶液中形成二聚体, 解离常数约为 10^{-9} mol/L或更低。镍离子结合二聚复合物的晶体结构揭示了一个V形二聚体, 其中单个镍离子以扭曲的八面体几何结构与两个单体的组氨酸和羟基喹啉部分结合。有趣的是, 金属离子诱导的蛋白质同源二聚化可以产生类似于BZIP型转录因子的结构叠加, 这为识别生物靶点提供了潜在的应用前景。利用金属离子诱导蛋白质二聚是控制生物过程的一种很有前途的方法。尽管如此, 金属-蛋白质相互作用缺乏选择性仍然是利用MDPSA设计蛋白质二聚化系统的一个重要障碍, 通常需要在设计过程中进行试错。通过将蛋白质表面的金属配位设计与蛋白质-蛋白质界面的计算设计相结合, 可以在一定程度上进行改善这一缺点。

3.2 核酸诱导同源蛋白质二聚化

G-四链体(G-quadruplex, G4)是由多个G四分体堆叠而成的四链体结构。在细胞事件中, G4的形成涉及许多生物过程, 如复制、转录、翻译和

端粒维持^[71]。因此, G4与蛋白质之间的特异性相互作用已成为调节生物过程的一种有前途的方法。研究表明, 含有GT重复序列的寡核苷酸可诱导HIV-1 Gag蛋白质二聚化^[72]。短寡核苷酸(GT)₃或(GT)₈与Gag蛋白的核衣壳(NC)结构域结合, 导致Gag构象发生变化, 有利于Gag二聚化。核酸诱导蛋白质二聚是研究蛋白质功能以及蛋白质二聚状态与激活之间相互作用的一种新途径, 不仅包括酶, 还包括许多其他同源蛋白质二聚化事件。

3.3 分子主客体系统诱导同源蛋白质二聚化

近年来, 通过超分子系统调控蛋白质二聚反应的研究得到了较多的进展。超分子系统在蛋白质二聚中的应用是基于超分子主体与特定客体分子的非共价相互作用, 同时将其附加在蛋白质上。其中, 超分子宿主分子环糊精和葫芦[8]脲(cucurbit[8]uril, 别称葫芦脲[8])在缓冲液和活细胞中作为选择性和可逆控制蛋白质二聚的工具得到了广泛的研究。超分子系统诱导的蛋白质二聚化的概念首先是利用附着在合成肽链上的超分子主客体元件来探索的。

β 环糊精可用于诱导蛋白质的同源二聚化^[73]。例如, 用TMe- β 环糊精(heptakis(2, 3, 6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin, TMe- β -CD)对牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)进行表面功能化, 使5,10,15,20-四(4磺酸苯基)卟啉通过与TMe- β 环糊精的络合可逆地控制BSA的同源二聚。所得到的超分子蛋白质二聚体是稳定的, 可以通过尺寸排阻色谱法从单体蛋白质中分离出来。

葫芦[8]脲是第二个有吸引力的超分子宿主分子, 可以用于可逆性蛋白质二聚化研究^[74]。葫芦[8]脲在其疏水腔内选择性地同时结合并二聚两个客体分子, 具有较高的亲和力。超分子宿主葫芦[8]脲也可以有效地用于可逆切换包含遗传编码的N端苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸(FGG)肽基序的荧光蛋白二聚化。带有FGG-tag的蛋白质在pH和温度的控制下, 内含子系统的自裂解容易产生具有FGG-tag的蛋白质。FGG-tag与葫芦[8]脲疏水腔的选择性结合诱导蛋白质二聚化, 并通过N端氨基官能团与葫芦[8]脲的羰基边缘产生关键相互作用, 导致蛋白质二聚化。

葫芦[8]脲诱导的蛋白质二聚化方法已应用于研究二聚化和胱天蛋白酶(caspase)-9激活的分子机制^[75]。Caspase-9是一种凋亡半胱氨酸蛋白酶, 在正常生理条件下主要以其无活性单体形式存在。

它在辅助因子诱导二聚化后变得活跃，并在细胞凋亡途径中发挥关键作用。Caspase-9 的 N 端含有 FGG 基序 (FGG-Caspase-9)，允许葫芦[8]脉诱导蛋白质二聚化，这一点通过动态光散射得到证实。酶的催化活性随着葫芦[8]脉添加量的增加而增加，直到所有 FGG-Caspase-9 二聚化时达到最大活性。葫芦[8]脉诱导的 FGG-Caspase-9 二聚体的活性不仅显著高于分离蛋白的活性，而且优于突变为具有

工程疏水二聚化界面的蛋白质。将竞争肽 (FGG) 添加到活性葫芦[8]脉诱导的 FGG-Caspase-9 二聚体后，酶的酶活性以剂量依赖性方式降低。因此，葫芦[8]脉-FGG 系统的可逆性表明，通过超分子主客体方法可以完全控制 FGG-Caspase-9 二聚化和激活，并且具有用特定小客体分子诱导或抑制蛋白质二聚化的潜力 (图3)。

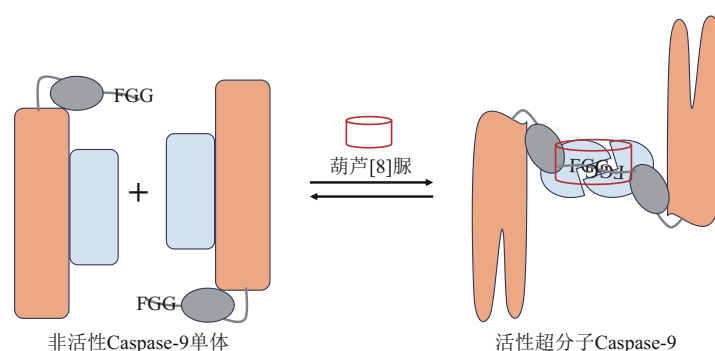


Fig. 3 Schematic diagram of homodimerization of N-terminal monomer Caspase-9 with FGG induced by cucurbit [8] uril
图3 葫芦[8]脉诱导N端带有FGG的单体Caspase-9同源二聚化示意图

超分子介导的蛋白质复合物的晶体结构已在葫芦[8]脉诱导的蛋白质 14-3-3 (涉及人类疾病, 包括乳腺癌靶标) 二聚化中进行了研究^[76]。在葫芦[8]脉存在下, 将 FGG-tag 与雌激素受体 α (ER α) 的 14-3-3 结合表位的 N 端融合可以简单地形成二聚肽。葫芦[8]脉诱导的 ER α 肽二聚通过二元二价的结合方式显著增强其对蛋白 14-3-3 的亲

力。晶体结构表明, 该复合物通过多种分子间相互作用得到良好的稳定^[77] (图4)。葫芦[8]脉可以作为二聚化的超分子诱导剂, 从而获得最佳的蛋白质重组和酶活性, 这为研究其他可逆的蛋白质同源二聚化事件, 如二聚化酶和膜受体蛋白提供了很大的希望。

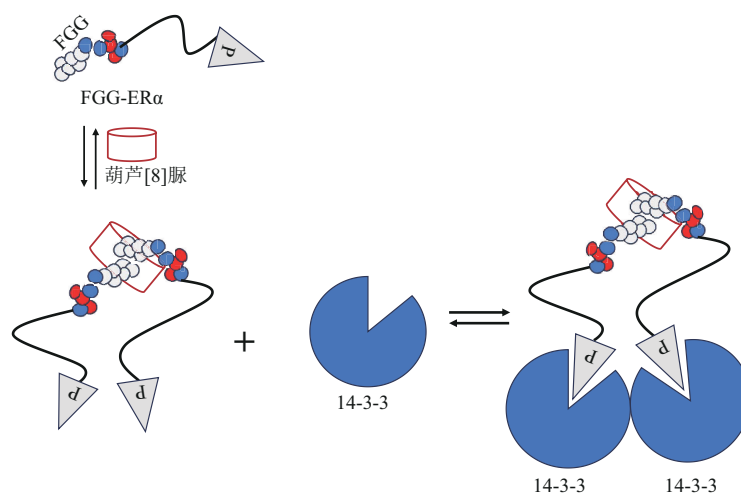


Fig. 4 Schematic representation of cucurbit [8] uril-induced protein assemblies of phosphopeptide (FGG-ER α) and protein 14-3-3
图4 葫芦[8]脉诱导的磷酸肽 (FGG-ER α) 和蛋白质14-3-3的蛋白质组装的示意图

4 总结与展望

同源蛋白质二聚化在几乎所有生物过程中都起着关键作用, 调控和了解此过程对于阐明生物系统的动力学, 剖析复杂的生物调控网络以及生物医学应用具有重要意义。然而, 目前仅存在数量有限的CID与LID系统, 对于新的二聚化系统的需求仍然很高, 开发新的二聚化系统将为解决日益复杂的生物问题铺平道路。对于CID系统, 设计具有所需灵敏度和选择性的新系统依然是蛋白质工程领域的挑战, 创建一个对任何给定配体具有所需灵敏度和特异性的系统更是一个悬而未决的问题。对于LID系统, 需要将新型光诱导策略与生物工程技术相结合, 为基于细胞的治疗和生物产品的制造提供创新的解决方案^[78]。

此外, 尽管二聚系统被广泛使用, 但其性能仍然存在缺陷。理想的二聚反应体系具有高特异性和结合亲和力、生物正交性、可逆性、操作简单、时空分辨率高等特点。当前二聚化系统固有的局限性仍然对在精确的时间和位置上微调细胞活性提出了挑战。

CID系统是一种调节蛋白质功能的强大工具, 通过添加化合物即可轻松操作, 并可通过控制化合物的剂量进行调节, 而且化学二聚剂可以穿透光无法到达的组织。与LID系统相对较低的结合亲和力(K_D 通常在微摩尔范围内)相比, CID系统诱导的结合相当稳定(K_D 在纳摩尔范围内)。然而, 此类试剂难以递送至细胞或从细胞中去除, 物质扩散需要时间, 时空调控的选择也有限。通过光诱导蛋白质二聚化具有独特的优势。光是一种正交刺激并且高度可调, 通过改变曝光的焦点、强度和频率, 可以实现高精度、时空感应, 从而实现信号通路或生物过程的选择性干扰。与化学诱导剂的刺激不同, 光可以更好地控制干扰, 并且与许多系统高度兼容, 因为它不需要转运蛋白质到达光感受器, 可以随意施加和去除。光遗传学工具的最大优点, 特别是其非侵入性、可逆性和高时空特异性, 弥补了化学诱导剂触发遗传开关的缺点^[79]。LID系统具有快速启动动力学、空间分辨率高和可切换可逆性特点, 但可能会受到动态范围有限以及对表达水平和细胞环境的敏感性的影响。此外, 光激活条件, 即波长和强度也是决定性因素, 因为短波长导致光的组织穿透性差, 而强照射会对细胞造成光毒性。

设计CID系统具有较高的难度, 基于非共价相

相互作用的超分子化学为调节蛋白质二聚化提供了一种有前途的策略。基于超分子系统诱导蛋白质二聚化具有良好的溶解度和生物相容性, 但与客体分子的相对较低的结合亲和力限制了其在蛋白质上的进一步应用。例如, 最广泛使用的主体分子环糊精与其客体的结合较弱, K_D 通常大于 10^{-5} mol/L。为了扩展其功能用途, 需要对宿主大环进行修饰, 从而赋予蛋白质新的性质。迫切需要开发易于获得的大环化合物或新大环化合物的修饰技术, 这些技术具有生物相容性, 对结构简单的客体部分具有较高结合亲和力, 并且易于修饰。虽然超分子化学已广泛用于调节蛋白质二聚化, 但通过在更多领域应用位点特异性蛋白质修饰, 预计其应用将大大扩展。

现有的大多数CID系统中的小分子是偶然发现的, 或者是对现有化合物的二次开发而设计的, 但我们仍然可以从一些报道中获得一些筛选和合理设计方向的见解。PPI界面上有一些对相互作用的总结能贡献很大的被称为“热点”的关键残基, 对于潜在的PPI或者结合亲和力较弱的PPI, CID系统中的小分子可以充当“热点”, 通过占据靶蛋白结合位点来介导蛋白质与蛋白质的结合。因此, 可以通过筛选能够与这些位点良好相互作用的小分子作为开发CID系统的起点。随后, 再根据特定的CID系统, 对小分子进行结构修饰以提高其作用力与协同性。此外, 对于未配制的蛋白质靶标, 也许能够使用对接软件找到两种蛋白质之间的互补界面并设计新型CID系统。近年来, 环肽和螺旋肽已经广泛用于PPI抑制剂的开发和设计, 这些肽具有大的结合界面和令人满意的结合亲和力, 使其成为新型CID系统的有希望的候选者, 因此, 有理由推测环肽和螺旋肽将来也可能被开发为CID系统。

此外, 化学光遗传学的应用, 弥补了CID系统的一些缺陷。最近, Chen等^[80]提出了一种新的化学光遗传学方法, 光开关化学诱导二聚化(photo switchable chemically induced dimerization, psCID), 用于通过蓝光以快速且可逆的方式控制细胞功能。而且, psCID是可控的, 即可以通过施加不同强度的光照微调蛋白质二聚化和去二聚化程度。使用这种方法, 可以高空间(μm)和时间(ms)精度控制活细胞中蛋白质的定位和细胞器的定位。psCID系统结合了CID与LID系统的优点, 具有可逆、可调且灵敏, 以及具有微米级的高空间分辨率等特点, 对于研究快速生物过程非常有价值。此外, 用于标签融合蛋白的光活化化学诱导二

聚化 (photo activatable chemically induced dimerization, photo-CID) 技术是调节亚细胞蛋白质易位和PPI最有前途的方法之一, Kowada等^[81]通过将笼状配体应用于BL-tag系统(使用突变 β 内酰胺酶的共价蛋白质标记系统)开发了photo-CID系统,并证明了其在活细胞中具有高时空分辨率的亚细胞蛋白质易位中的应用。总而言之,这些诱导同源蛋白质二聚化的方法为生物医学应用以及解剖复杂的生物调控网络提供了工具并具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zhu J, Avakyan N, Kakkis A, *et al.* Protein assembly by design. *Chem Rev*, 2021, **121**(22): 13701-13796
- [2] Singh S S, Jois S D. Chapter one homo- and heterodimerization of proteins in cell signaling: inhibition and drug design. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2018, **111**: 1-59
- [3] Gaber A, Pavšič M. Modeling and structure determination of homo-oligomeric proteins: an overview of challenges and current approaches. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(16): 9081
- [4] Helton L G, Soliman A, von Zweydford F, *et al.* Allosteric inhibition of Parkinson's-linked LRRK2 by constrained peptides. *ACS Chem Biol*, 2021, **16**(11): 2326-2338
- [5] Wang W, Shen J. Fluorogenic chemically induced dimerization. *Nat Meth*, 2023, **20**: 1454-1455
- [6] Lackner R M, O'Connell W, Zhang H, *et al.* A general strategy for the design and evaluation of heterobifunctional tools: applications to protein localization and phase separation. *ChemBioChem*, 2022, **23**(16): e202200209
- [7] Wu Y W. Controlling cellular activities with light. *Nat Meth*, 2023, **20**: 357-358
- [8] Yamazoe S, Tom J, Fu Y, *et al.* Heterobifunctional molecules induce dephosphorylation of kinases-a proof of concept study. *J Med Chem*, 2020, **63**(6): 2807-2813
- [9] Fang Y, He Q, Cao J. Targeted protein degradation and regulation with molecular glue: past and recent discoveries. *Curr Med Chem*, 2022, **29**(14): 2490-2503
- [10] Belshawl P J, Spencer D M, Crabtree G R, *et al.* Controlling programmed cell death with a cyclophilincyclosporin-based chemical inducer of dimerization. *Chem Biol*, 1996, **3**(9): 731-738
- [11] Khan M I, Hariprasad G. Human secretory phospholipase A2 mutations and their clinical implications. *J Inflamm Res*, 2020, **13**: 551-561
- [12] Modell A E, Lai S, Nguyen T M, *et al.* Bifunctional modalities for repurposing protein function. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(7): 1081-1089
- [13] Gerry C J, Schreiber S L. Unifying principles of bifunctional, proximity-inducing small molecules. *Nat Chem Biol*, 2020, **16**: 369-378
- [14] Wu H, Yao H, He C, *et al.* Molecular glues modulate protein functions by inducing protein aggregation: a promising therapeutic strategy of small molecules for disease treatment. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(9): 3548-3566
- [15] Spencer D M, Wandless T J, Schreiber S L, *et al.* Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science*, 1993, **262**(5136): 1019-1024
- [16] Dang D T. Molecular approaches to protein dimerization: opportunities for supramolecular chemistry. *Front Chem*, 2022, **10**: 829312
- [17] Farrar M A, Olson S H, Perlmutter R M. Coumermycin-induced dimerization of GyrB-containing fusion proteins. *Methods Enzymol*, 2000, **327**: 421-429
- [18] Graves B, Thompson T, Xia M, *et al.* Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(29): 11788-11793
- [19] Klein A M, Biderman L, Tong D, *et al.* MDM2, MDMX, and p73 regulate cell-cycle progression in the absence of wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(44): e2102420118
- [20] Wojtaszek J L, Chatterjee N, Najeeb J, *et al.* A small molecule targeting mutagenic translesion synthesis improves chemotherapy. *Cell*, 2019, **178**(1): 152-159.e11
- [21] Mansilla S F, Bertolin A P, Venerus Arbilla S, *et al.* Polymerase ι (Pol ι) prevents PrimPol-mediated nascent DNA synthesis and chromosome instability. *Sci Adv*, 2023, **9**(15): eade7997
- [22] Taglialatela A, Leuzzi G, Sannino V, *et al.* REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps. *Mol Cell*, 2021, **81**(19): 4008-4025.e7
- [23] Zak K M, Grudnik P, Guzik K, *et al.* Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget*, 2016, **7**(21): 30323-30335
- [24] Muszak D, Surmiak E, Plewka J, *et al.* Terphenyl-based small-molecule inhibitors of programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 protein-protein interaction. *J Med Chem*, 2021, **64**(15): 11614-11636
- [25] Liu L, Yao Z, Wang S, *et al.* Syntheses, biological evaluations, and mechanistic studies of benzo[c][1,2,5]oxadiazole derivatives as potent PD-L1 inhibitors with *in vivo* antitumor activity. *J Med Chem*, 2021, **64**(12): 8391-8409
- [26] OuYang Y, Gao J, Zhao L, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of *o*-(Biphenyl-3-ylmethoxy)nitrophenyl derivatives as PD-1/PD-L1 inhibitors with potent anticancer efficacy *in vivo*. *J Med Chem*, 2021, **64**(11): 7646-7666
- [27] Wang T, Cai S, Wang M, *et al.* Novel biphenyl pyridines as potent small-molecule inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction. *J Med Chem*, 2021, **64**(11): 7390-7403
- [28] Song Z, Liu B, Peng X, *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of biaryl-containing PD-1/PD-L1 interaction inhibitors bearing a unique difluoromethyleneoxy linkage. *J Med Chem*, 2021, **64**(22): 16687-16702
- [29] Zhang H, Xia Y, Yu C, *et al.* Discovery of novel small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction *via* structural simplification strategy. *Molecules*, 2021, **26**(11): 3347
- [30] Ladenson R C, Crimmins D L, Landt Y, *et al.* Isolation and

- characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal Chem*, 2006, **78**(13): 4501-4508
- [31] Lesne J, Chang H J, De Visch A, *et al*. Structural basis for chemically-induced homodimerization of a single domain antibody. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 1840
- [32] Li Q Z, Zuo Z W, Zhou Z R, *et al*. Polyamine homeostasis-based strategies for cancer: the role of combination regimens. *Eur J Pharmacol*, 2021, **910**: 174456
- [33] Chai X, Zhan J, Pan J, *et al*. The rational discovery of multipurpose inhibitors of the ornithine decarboxylase. *FASEB J*, 2020, **34**(9): 10907-12921
- [34] Kopytek S J, Standaert R F, Dyer J C, *et al*. Chemically induced dimerization of dihydrofolate reductase by a homobifunctional dimer of methotrexate. *Chem Biol*, 2000, **7**(5): 313-321
- [35] Zhou L, Fang C, Wei P, *et al*. Chemically induced dimerization of human nonpancreatic secretory phospholipase A2 by bis-indole derivatives. *J Med Chem*, 2008, **51**(12): 3360-3366
- [36] Tanaka M, Roberts J M, Seo H S, *et al*. Design and characterization of bivalent BET inhibitors. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(12): 1089-1096
- [37] Waring M J, Chen H, Rabow A A, *et al*. Potent and selective bivalent inhibitors of BET bromodomains. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**: 1097-1104
- [38] Maniaci C, Hughes S J, Testa A, *et al*. Homo-PROTACs: bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 830
- [39] Ishida T, Ciulli A. E3 ligase ligands for PROTACs: how they were found and how to discover new ones. *SLAS Discov*, 2021, **26**(4): 484-502
- [40] Steinebach C, Lindner S, Udeshi N D, *et al*. Homo-PROTACs for the chemical knockdown of cereblon. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(9): 2771-2782
- [41] Junk L, Schmiedel V M, Guha S, *et al*. Homo-BacPROTAC-induced degradation of ClpC1 as a strategy against drug-resistant mycobacteria. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 2005
- [42] Gharior R, Francis R M, DeForest C A. Chemical and biological engineering strategies to make and modify next-generation hydrogel biomaterials. *Matter*, 2023, **6**(12): 4195-4244
- [43] Lindner F, Diepold A. Optogenetics in bacteria - applications and opportunities. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, **46**(2): fuab055
- [44] Huang P, Zhao Z, Duan L. Optogenetic activation of intracellular signaling based on light-inducible protein-protein homo-interactions. *Neural Regen Res*, 2022, **17**(1): 25-30
- [45] Tan P, He L, Huang Y, *et al*. Optophysiology: illuminating cell physiology with optogenetics. *Physiol Rev*, 2022, **102**(3): 1263-1325
- [46] Arinkin V, Granzin J, Jaeger K E, *et al*. Conserved signal transduction mechanisms and dark recovery kinetic tuning in the pseudomonadaceae short light, oxygen, voltage (LOV) protein family. *J Mol Biol*, 2024, **436**(5): 168458
- [47] Wang J, Song J, Zhang X, *et al*. DNA-programed plasmon rulers decrypt single-receptor dimerization on cell membrane. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(2): 1273-1284
- [48] Crossman S H, Janovjak H. Light-activated receptor tyrosine kinases: designs and applications. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, **63**: 102197
- [49] Li J, Huang Y, Su Z, *et al*. The recovery of KaiA's activity depends on its N-terminal domain and KaiB in the cyanobacterial circadian clock. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **524**(1): 123-128
- [50] LaBelle J, Woo S. Light-induced GFP expression in zebrafish embryos using the optogenetic TAE/C120 system. *J Vis Exp*, 2021(174). DOI: 10.3791/62818
- [51] Nash A I, McNulty R, Shillito M E, *et al*. Structural basis of photosensitivity in a bacterial light-oxygen-voltage/helix-turn-helix (LOV-HTH) DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(23): 9449-9454
- [52] Zhang J, Luo Y, Poh C L. Blue light-directed cell migration, aggregation, and patterning. *J Mol Biol*, 2020, **432**(10): 3137-3148
- [53] Ding Q, Ma D, Liu G Q, *et al*. Light-powered *Escherichia coli* cell division for chemical production. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2262
- [54] Emiliani V, Entcheva E, Hedrich R, *et al*. Optogenetics for light control of biological systems. *Nat Rev Meth Primers*, 2022, **2**: 55
- [55] Shao K, Zhang X, Li X, *et al*. The oligomeric structures of plant cryptochromes. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, **27**: 480-488
- [56] Taslimi A, Vrana J D, Chen D, *et al*. An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function. *Nat Commun*, 2014, **5**: 4925
- [57] Huang Dennis Z, Benman W, Dong L, *et al*. Rapid optogenetic clustering in the cytoplasm with BcLOVclust. *J Mol Biol*, 2024, **436**(3): 168452
- [58] Baumschlager A, Khammash M. Synthetic biological approaches for optogenetics and tools for transcriptional light-control in bacteria. *Adv Biol (Weinh)*, 2021, **5**(5): e2000256
- [59] Reichhart E, Ingles-Prieto A, Tichy A M, *et al*. A phytochrome sensory domain permits receptor activation by red light. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(21): 6339-6342
- [60] Leopold A V, Thankachan S, Yang C, *et al*. A general approach for engineering RTKs optically controlled with far-red light. *Nat Meth*, 2022, **19**: 871-880
- [61] Romano E, Baumschlager A, Akmeriç E B, *et al*. Engineering AraC to make it responsive to light instead of Arabinose. *Nat Chem Biol*, 2021, **17**: 817-827
- [62] Jones E M, Marken J P, Silver P A. Synthetic microbiology in sustainability applications. *Nat Rev Microbiol*, 2024, **22**: 345-359
- [63] Andrikopoulos P C, Chaudhari A S, Liu Y, *et al*. QM calculations predict the energetics and infrared spectra of transient glutamine isomers in LOV photoreceptors. *Phys Chem Chem Phys*, 2021, **23**(25): 13934-13950
- [64] Qian Y, Li T, Zhou S, *et al*. A single-component optogenetic Gal4-UAS system allows stringent control of gene expression in zebrafish and drosophila. *ACS Synth Biol*, 2023, **12**(3): 664-671
- [65] Dionisi S, Piera K, Baumschlager A, *et al*. Implementation of a novel optogenetic tool in mammalian cells based on a split T7

- RNA polymerase. *ACS Synth Biol*, 2022, **11**(8): 2650-2661
- [66] Imtiaz S, Anwar S, Zada L, *et al.* Fluorescence spectroscopy for the assessment of microbial load in UVC treated water. *J Fluoresc*, 2023, **33**(6): 2339-2347
- [67] Duplus-Bottin H, Spichy M, Triqueneaux G, *et al.* A single-chain and fast-responding light-inducible Cre recombinase as a novel optogenetic switch. *Elife*, 2021, **10**: e61268
- [68] Salgado E N, Lewis R A, Mossin S, *et al.* Control of protein oligomerization symmetry by metal coordination: C2 and C3 symmetrical assemblies through Cu(II) and Ni(II) coordination. *Inorg Chem*, 2009, **48**(7): 2726-2728
- [69] Chen X, Zhang T, Liu H, *et al.* Shape-anisotropic assembly of protein nanocages with identical building blocks by designed intermolecular π - π interactions. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, **10**(35): e2305398
- [70] Kakkis A, Golub E, Choi T S, *et al.* Redox- and metal-directed structural diversification in designed metalloprotein assemblies. *Chem Commun*, 2022, **58**(49): 6958-6961
- [71] Paeschke K, Burkovics P. Mgs1 function at G-quadruplex structures during DNA replication. *Curr Genet*, 2021, **67**(2): 225-230
- [72] Zhao H, Datta S A K, Kim S H, *et al.* Nucleic acid-induced dimerization of HIV-1 Gag protein. *J Biol Chem*, 2019, **294**(45): 16480-16493
- [73] Teixeira R, Serra V V, Botequim D, *et al.* Fluorescence spectroscopy of porphyrins and phthalocyanines: some insights into supramolecular self-assembly, microencapsulation, and imaging microscopy. *Molecules*, 2021, **26**(14): 4264
- [74] Cao W, Qin X, Liu T. When supramolecular chemistry meets chemical biology: new strategies to target proteins through host-guest interactions. *ChemBiochem*, 2021, **22**(20): 2914-2917
- [75] Dang D T, Nguyen H D, Merckx M, *et al.* Supramolecular control of enzyme activity through cucurbit[8]uril-mediated dimerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(10): 2915-2919
- [76] Liu Y H, Zhang Y M, Yu H J, *et al.* Cucurbituril-based biomacromolecular assemblies. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(8): 3870-3880
- [77] de Vink P J, Briels J M, Schrader T, *et al.* A binary bivalent supramolecular assembly platform based on cucurbit[8]uril and dimeric adapter protein 14-3-3. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(31): 8998-9002
- [78] Mansouri M, Strittmatter T, Fussenegger M. Light-controlled mammalian cells and their therapeutic applications in synthetic biology. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, **6**(1): 1800952
- [79] Guan N, Gao X, Ye H. Engineering of optogenetic devices for biomedical applications in mammalian synthetic biology. *Eng Biol*, 2022, **6**(2/3): 35-49
- [80] Chen X, Wu Y W. Tunable and photoswitchable chemically induced dimerization for chemo-optogenetic control of protein and organelle positioning. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(23): 6796-6799
- [81] Kowada T, Arai K, Yoshimura A, *et al.* Optical manipulation of subcellular protein translocation using a photoactivatable covalent labeling system. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(20): 11378-11383

Methods for Inducing Homologous Protein Dimerization*

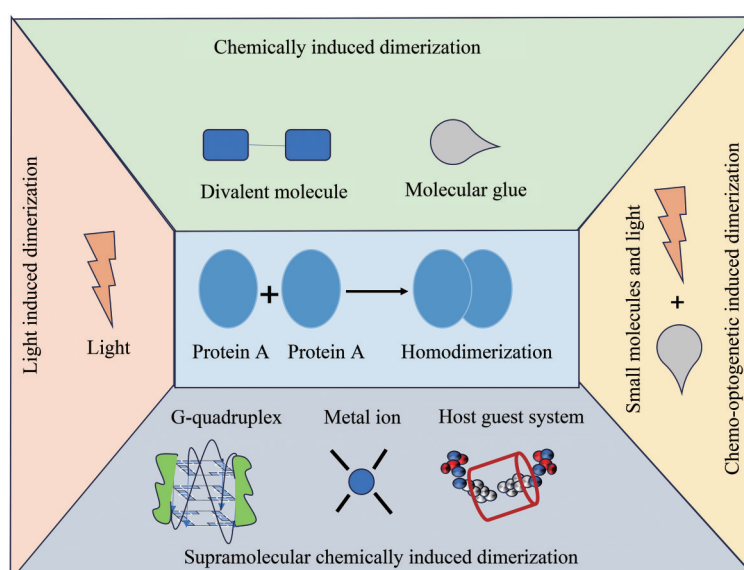
GUO Jun-Xia^{1,3)}, LIU Sen^{1,2)**}

⁽¹⁾Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation (Ministry of Education & Hubei Province), College of Life Science and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

²⁾Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), College of Life Science and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

³⁾Hubei WEL-SAFE Biotechnology Co., Ltd., Ezhou 436006, China)

Graphical abstract



Abstract Proteins in biological systems rarely act alone, but instead bind with other biomolecules to trigger specific cellular reactions. These biomolecules are usually astonishing number of proteins self-assemble to form dimers, which are both in a relatively isolated state and in a protein interaction network and cascade. Dimerization can endow proteins with various structural and functional advantages, including improving stability, controlling the accessibility and specificity of active sites, and increasing complexity. The self-association of proteins to form dimers is a very common phenomenon, and the functional importance of homologous protein dimerization cannot be overestimated. It provides diversity and specificity in many pathways, and most cellular events, such as signal transduction, transcription cofactor recruitment, enzyme activation, and even pathogenic pathways, are significantly regulated through homologous protein-protein interactions. The regulation of protein dimerization is

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31971150), Creative Research Groups grant of Hubei Province (2024AFA014), and The Project of Hubei Province Fund for Distinguished Young Scholars (2019CFA069).

** Corresponding author.

Tel: 86-27-59590100, E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

Received: March 15, 2024 Accepted: May 30, 2024

an important process for the growth and development of organisms under internal or external stimuli in the natural environment. Therefore, regulating the dimerization process of homologous proteins and understanding their molecular mechanisms are crucial for biomedical applications and analyzing complex biological regulatory networks. Proximity effects or physical proximity effects of molecules are essential regulatory factors in biological processes, which can be controlled through induced dimerization methods. The application range of induced proximity ranges from manipulating protein folding, activation, localization, and degradation to controlling gene transcription or cell therapy. The chemical induced dimerization (CID) system and light induced dimerization (LID) system based on proximity induction provide powerful tools for regulating the function of dimerized proteins, and have been gradually developed. The concept of CID was proposed as early as 1993. The basic principle of CID is that a small molecule controls the dimerization of a pair of proteins or domains, while binding two proteins and bringing them closer together. Small molecules in the CID system form ternary complexes with target proteins, which can bind to various sites, including “hotspot” and “allosteric sites”. Small molecules play a role by regulating protein proximity. The light induced dimerization system uses photosensitive proteins to undergo conformational changes under light, thereby inducing protein interactions. Multiple photosensitive proteins derived from plants and microorganisms can undergo photo induced homologous interactions, and relying on LID systems, they can be used to study various biological processes, including cell signal transduction, microbial synthesis, and biomedical applications. In recent years, metal ions, nucleic acids, and molecular host guest systems have been proposed as new methods for orthogonal control of homologous protein dimerization, expanding the development and application of dimerization systems. In addition, the chemoptogenetic approach combines the advantages of CID and LID systems and has also been applied in inducing protein dimerization. This review elaborates on the methods and applications of inducing homodimerization of proteins through CID system, LID system, and supramolecular chemistry, while discussing the advantages and disadvantages of dimerization systems. The development direction of dimerization systems is also discussed, in order to provide some reference and ideas for the future application and development of homologous protein dimerization.

Key words protein-protein interaction, proximity induction, homodimerization, CID, LID

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0106