



膜受体蛋白质机器动态修饰的发现及表征

翁亦澄^{1,2†}, 郑江南^{1†}, 田瑞军^{1*}

1. 南方科技大学理学院化学系, 化学生物学与组学分析研究中心, 深圳 518055

2. 上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200240

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: tianrj@sustech.edu.cn

收稿日期: 2024-09-28; 接受日期: 2024-11-21; 网络版发表日期: 2024-12-31

国家自然科学基金(编号: 92253304, 22125403, 32201218, 22104047)和深圳市科技计划(编号: ZDSYS20230626090803004, KJZD20230923114-220041, JSGGZD20220822095200001)资助项目

摘要 膜受体蛋白质机器通过动态翻译后修饰调控蛋白质复合物组装, 以时空特异的方式精准地控制细胞的生物学表型. 基于质谱的蛋白质组学目前已经成为动态翻译后修饰和蛋白质复合物分析的主流技术平台. 本课题组以化学生物学工具赋能质谱技术为研究思路, 围绕着生理、病理环境中的膜受体蛋白质机器动态酪氨酸磷酸化修饰和蛋白质复合物取得了一些重要进展: 通过化学探针捕获与富集相互作用的蛋白质, 鉴定了在肿瘤微环境中的配体-膜蛋白受体相互作用与免疫过程中酪氨酸磷酸化介导形成的蛋白质机器; 另一方面, 通过开发活细胞中的化学生物学工具, 描绘了特定时空条件下膜受体蛋白质机器调控的动态复合物与磷酸化级联过程.

关键词 膜受体蛋白质机器, 蛋白质组学, 蛋白质复合物, 酪氨酸磷酸化

1 引言

膜受体能够感知细胞的环境, 包括神经递质、激素和药物, 调控多种多样的生物学表型, 其异常调控与癌症等疾病紧密相关^[1]. 蛋白质通常通过与其他蛋白质相互作用, 形成蛋白质机器来实现其功能. 蛋白质的相互作用网络比转录组和蛋白质组更为复杂多变, 能够迅速响应外界环境的变化, 以精确调控关键的生物学表型. 膜受体蛋白质机器的形成通过多种高度动态的翻译后修饰来实现快速的调节^[2]: 酪氨酸磷酸化能够导致下游蛋白质依次发生磷酸化, 形成磷酸化级联反应, 这种连锁反应有助于放大初始信号, 从而

促进细胞内的信号传递; 酪氨酸磷酸化也能被特定的蛋白结构识别, 二者的相互作用是膜受体蛋白质机器组装的一种结构基元. 这些特性相互交织, 构成了复杂的蛋白质机器结构, 极大地丰富了蛋白质编码基因的分子形态和功能多样性. 因此, 系统性地分析这些受体复合物机器, 有助于我们深入理解细胞间和细胞内的信号转导过程, 以及它们在生理和病理状态下是如何被组织和调节的.

基于质谱(mass spectrometry, MS)的蛋白质组学已成为蛋白质复合物分析的主流技术平台, 其中亲和纯化-质谱方法(affinity purification-MS, AP-MS)是分析蛋白质复合物的经典策略. 该方法通过特异性抗体或

引用格式: Weng Y, Zheng J, Tian R. Discovery and characterization of dynamic modifications of membrane receptor protein machinery. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 737-747, doi: 10.1360/SSC-2024-0230

免疫标签从细胞裂解物中将目标蛋白质与其相互作用的蛋白质一起亲和纯化, 再进行MS鉴定. 过去20年, 前人采用AP-MS方法对人类和其他模式物种中的蛋白质复合物进行了大规模分析, 构建了以细胞质蛋白质复合物为主的蛋白质相互作用数据集^[3]. 然而, 由于AP-MS是基于细胞裂解液的体外分析方法, 无法分析活细胞状态的动态蛋白质相互作用, 并且不适用于疏水性膜蛋白质复合物的分析. 面向真实环境中蛋白质复合物高度时间、空间特异的挑战, 各种基于质谱研究受体蛋白质复合物的新型蛋白质组学方法不断开发, 如共分馏-质谱(co-fractionation-MS)^[4]、热邻近共聚集(thermal proximity coaggregation)^[5]、邻近标记(proximity labeling)^[6]等. 在此背景下, 本课题组围绕着真实环境中膜受体复合物开展了一系列的化学生物学和蛋白质组学工作, 包括但不限于间接/直接蛋白质复合物、细胞外蛋白质复合物、翻译后修饰依赖的蛋白质复合物、时空蛋白质复合物和整个信号通路的蛋白质组装(图1). 本文将对本课题组近年来的相关工作进行总结.

2 受体膜蛋白质膜外区复合物的发现

细胞间的通讯主要通过分泌蛋白质和质膜蛋白质来实现, 这对于协调细胞增殖、迁移和分化等关键细

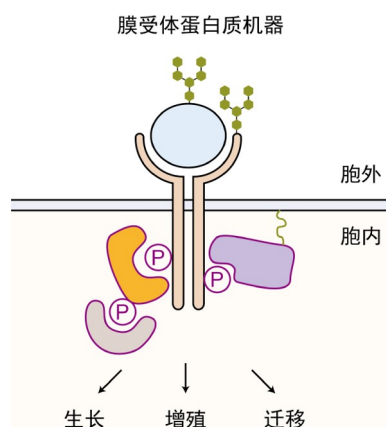


图 1 (网络版彩图)膜受体蛋白质机器示意图. 膜受体蛋白质机器通过胞外域特异地结合对应配体, 胞内域通过磷酸化等翻译后修饰, 产生高度动态的时空变化

Figure 1 (Color online) Schematic of the membrane receptor protein machinery. The membrane receptor protein machinery binds to the corresponding ligand specifically through the extracellular domain. The intracellular domain has highly dynamic changes in time and space upon post-translational modifications such as phosphorylation.

胞活动至关重要. 在正常组织中, 细胞通过精确控制信号配体(如生长因子、细胞因子和趋化因子)与特定细胞表面受体的结合, 来维持细胞的稳态和组织的正常功能. 然而, 这些信号通路的异常调控与多种疾病的发生密切相关, 尤其是在肿瘤微环境中, 生理配体与受体之间的相互作用失衡会促进癌症的生长和转移. 因此, 深入研究细胞间的配体-受体相互作用不仅有助于我们理解基础生物学, 还能为药物开发提供潜在的靶点. 尽管质谱技术的发展为识别细胞裂解物中的蛋白质-蛋白质和小分子-蛋白质相互作用提供了可能, 但要无偏倚且明确地识别配体-受体相互作用仍然是一个挑战. 这主要是因为这些相互作用具有瞬时性, 且分析质膜蛋白质时需要面对疏水性和低丰度等挑战. 此外, 细胞表面蛋白质通常需要在生理环境中, 即活细胞或组织内, 才能展现出其特有的结合特性. 因此, 开发可靠的方法, 以便在生物背景下系统地识别这些细胞间信号复合物, 是该领域研究的关键. 这样的方法将有助于更全面地理解细胞通讯的复杂性, 并为疾病的诊断和治疗提供新的策略.

近年来, 新兴的原位蛋白质复合物鉴定技术能够直接提供生物过程中真实发生的蛋白质相互作用信息. 原位交联质谱技术虽然在捕获低亲和力的蛋白质相互作用方面具备一定优势, 但其灵敏度受到交联效率低下和样品复杂性的限制^[7]. Wollschlaeger等通过“基于配体的受体捕获”技术, 如TRICEPS^[8]和HATRIC^[9], 实现了在活细胞上的选择性配体-受体交联, 但这些方法需要大量纯化的配体和细胞, 限制了其在原代细胞研究中的应用. 最近开发的 μ Map^[10]等邻近标记方法为绘制目标蛋白质的细胞表面蛋白质复合物提供了独特的工具. 然而, 这些假设驱动的方法需要事先确认目标蛋白质, 进而以目标蛋白质为实验设计的核心, 捕获其相互作用组.

为了克服这些限制, 本课题组^[11]开发了一种名为相互作用引导交联(interaction-guided crosslinking, IGC)的无预先假设的化学蛋白质组学策略, 旨在全面揭示活细胞上的原位细胞间信号复合物. 这项工作设计了三种具有配体偶联基团、交联基团和生物素基团的三功能探针. 这些探针的间隔臂长度约为60 Å, 非常适合蛋白质间的交联. 在IGC方法中, 首先利用活化酯或肟连接将细胞条件培养基中的分泌蛋白质组与探针结合. 当分泌配体蛋白质与活细胞表面的受体结合后,

洗去未结合的蛋白质。随后, 配体-受体复合物可以在生理条件下通过紫外线照射或添加Cu(I)催化剂选择性地原位交联。交联的复合物通过链霉亲和素珠富集, 经酶消化后通过液相色谱-串联质谱分析鉴定(图2)。IGC方法只需10 ng的分泌配体, 即可在少至10万个活细胞中鉴定所对应的受体。所需的配体量仅为前人方法的千分之一, 并且所需细胞量降低了一个数量级, 其灵敏度和选择性能够系统地鉴定细胞分泌组和表面组之间形成的配体-受体复合物。

本课题组采用IGC技术研究了胰腺癌细胞微环境中细胞因子的相互作用网络。首先利用探针标记胰腺癌细胞的培养条件培养基, 然后与糖代谢标记的原代胰腺星状细胞共孵育。通过比较孵育前后胰腺星状细胞的蛋白质组, 鉴定了参与胰腺星状细胞相互作用的分泌

蛋白质。然后使用IGC方法鉴定这些分泌蛋白质的受体膜蛋白质, 此研究共鉴定出癌细胞向星状细胞传递的36种分泌配体蛋白配体和星状细胞表面的6种受体。通过对这些可能的相互作用进行定量评分, 推测尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活因子(PLAU)蛋白质极有可能参与了胰腺癌细胞微环境中的细胞通讯。进一步的验证实验确定了PLAU能激活胰腺星状细胞的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和蛋白激酶B (AKT)信号通路, 促进细胞增殖。使用IGC方法在寻找到了神经纤毛蛋白1 (NRP1)这一在胰腺癌中高表达的受体, 并确认了与PLAU之间有强相互作用($K_d = 9.5$ nM)。此研究为在起始材料受限的情况下系统探索新的配体-受体对和发现关键的细胞间信号传导事件提供了一种新颖的化学蛋白质组学研究工具^[11]。

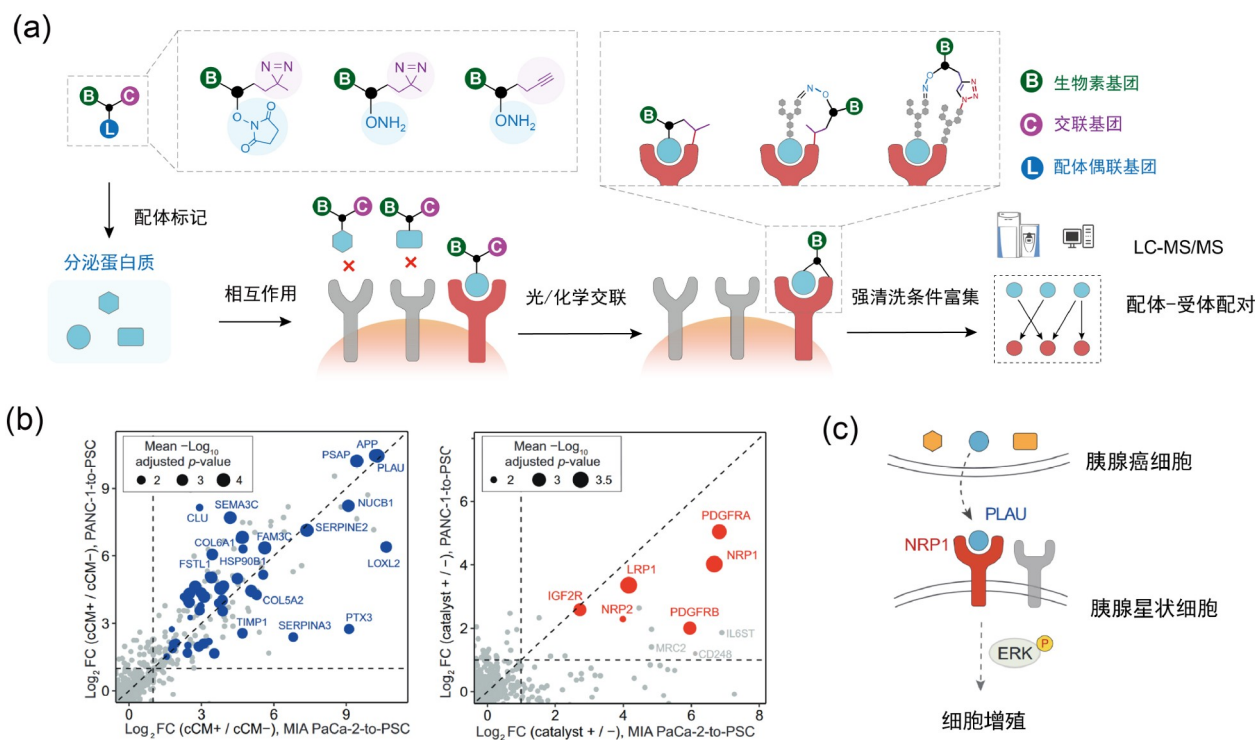


图 2 (网络版彩图) 使用IGC策略鉴定配体-受体复合物。(a) IGC策略示意图。用三功能探针标记条件培养基中的分泌蛋白, 在配体特异地与对应受体结合后, 使用光或者化学交联的方法共价交联发生相互作用的配体-受体对。生物素化的配体-受体交联复合物使用强清洗条件富集后使用液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)定量分析。(b) 鉴定胰腺癌肿瘤微环境中的配体-受体复合物。(c) 胰腺癌细胞通过PLAU-NRP1相互作用促进胰腺星状细胞细胞增殖示意图^[11]

Figure 2 (Color online) Identifying ligand-receptor complex by IGC strategy. (a) Schematic of the IGC strategy. Secreted proteins in conditioned medium are labeled with trifunctional probes. After the ligands bind specifically to the corresponding receptors, the interacting ligand-receptor pairs are covalently crosslinked using photo or chemical cross-linking methods. The biotinylated ligand-receptor cross-linked complexes are enriched using strong washing conditions and then quantitatively analyzed using liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). (b) Ligand-receptor complexes identification in the microenvironment of the pancreatic cancer. (c) Schematic of pancreatic cancer cells promoting the proliferation of pancreatic stellate cells through PLAU-NRP1 interaction ^[11].

3 受体膜内区蛋白质机器的发现

蛋白质酪氨酸激酶是细胞通讯的关键组分, 它们是一类功能多样的信号蛋白质, 负责协调细胞迁移、存活、增殖等重要生物过程。这些激酶的异常信号转导与多种人类疾病相关, 尤其在癌症中扮演着驱动因素的角色^[12]。目前, 已有超过50种酪氨酸激酶抑制剂被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于癌症治疗, 其中格列卫是最早成功的分子药物之一。酪氨酸激酶信号的传递通常从细胞膜上的受体酪氨酸激酶(RTK)或非受体酪氨酸激酶(nRTK)开始。这些激酶通过磷酸化邻近的酪氨酸残基来启动信号级联, 形成蛋白质相互作用模块的结合位点, 招募含有SH2 (Src homology 2)等酪氨酸磷酸化识别结构域的蛋白质, 并进一步传递信号^[13]。尽管已有超过40000个酪氨酸磷酸化位点被报道, 但其中只有少数部分被明确地与特定的信号级联相关联, 更多酪氨酸磷酸化位点的调控功能以及介导的相互作用有待进一步阐明。

3.1 完整表征多重磷酸化修饰依赖的膜受体蛋白质机器

系统解析免疫辅助类受体的酪氨酸磷酸化(phosphotyrosine, pTyr)依赖的蛋白质机器, 对于理解免疫治疗中涉及的信号通路至关重要。然而, 这些膜受体的膜内区经常含有多个磷酸化位点, 研究各个pTyr位点的基序特异性相互作用组具有挑战性。以关键的免疫受体CD28为例, 其含有超过40个氨基酸的胞质序列和多个酪氨酸磷酸化位点, 这些位点可以协调多个蛋白质的结合或共同结合成一个复合物, 调节T细胞的免疫响应过程^[14]。不同的酪氨酸磷酸化基序, 长度通常在10~20个氨基酸之间, 可以协调不同的信号复合物组装。然而, 研究这些信号蛋白质的挑战在于人工截断胞质序列可能会破坏天然结合, 导致AP-MS结果不准确。一种替代方法是在目标蛋白质中引入表位标签, 通过细胞刺激和裂解后富集完整的蛋白质复合物, 但这种方法在研究膜受体时无法精准地控制磷酸化修饰的程度和位点, 难以建立准确的磷酸化位点与蛋白质的相互作用关系。

为此, 本课题组合成了三种在特定位点具有pTyr修饰和光反应的甲硫氨酸类似物(Photo-Met)的全长CD28膜内区探针, 用于精确捕获CD28胞内域的相互

作用组。Photo-Met侧链上的二氮丙啶基团在紫外线照射下能够生成高活性的卡宾, 与邻近的相互作用蛋白共价交联。随后, 使用链霉亲和素微球捕获交联产物, 并在变性条件下进行充分洗涤(图3a, b)。通过无标定量的质谱分析, 精准描绘了具有基序特异性的CD28胞内域直接相互作用组(图3c)。此研究发现了磷脂酶C γ 1 (PLCG1)通过磷酸化的YMNMM基序、蛋白激酶C θ (PRKCQ)通过磷酸化的AXYRS基序与CD28相互作用。此研究通过生物膜干涉技术测定了PRKCQ的C2结构域与218位点的亲和力($K_d = 70.1 \pm 1.4$ nM), 并通过紫外光解离-非变性质谱技术(UVPD-native MS), 表征了磷酸化相互作用界面。此研究为进一步剖析CD28在T细胞信号传导和免疫疗法中的分子机制提供了详细的分子线索^[15]。

3.2 捕获翻译后修饰依赖的蛋白质机器

肿瘤诊断通常使用免疫组织化学或基因组测序来

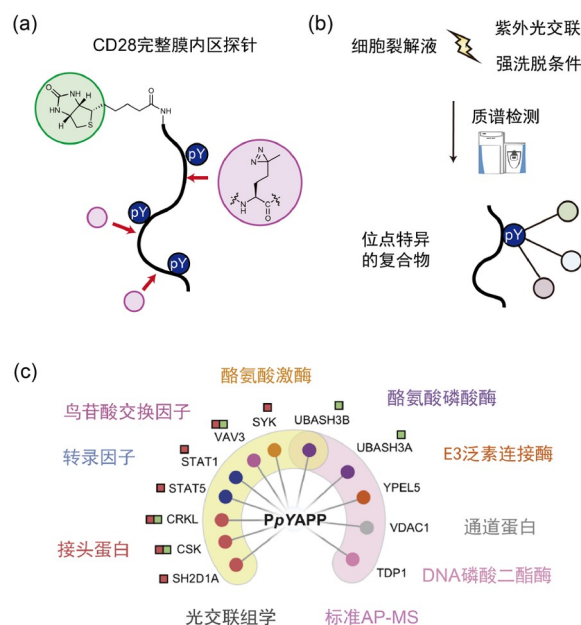


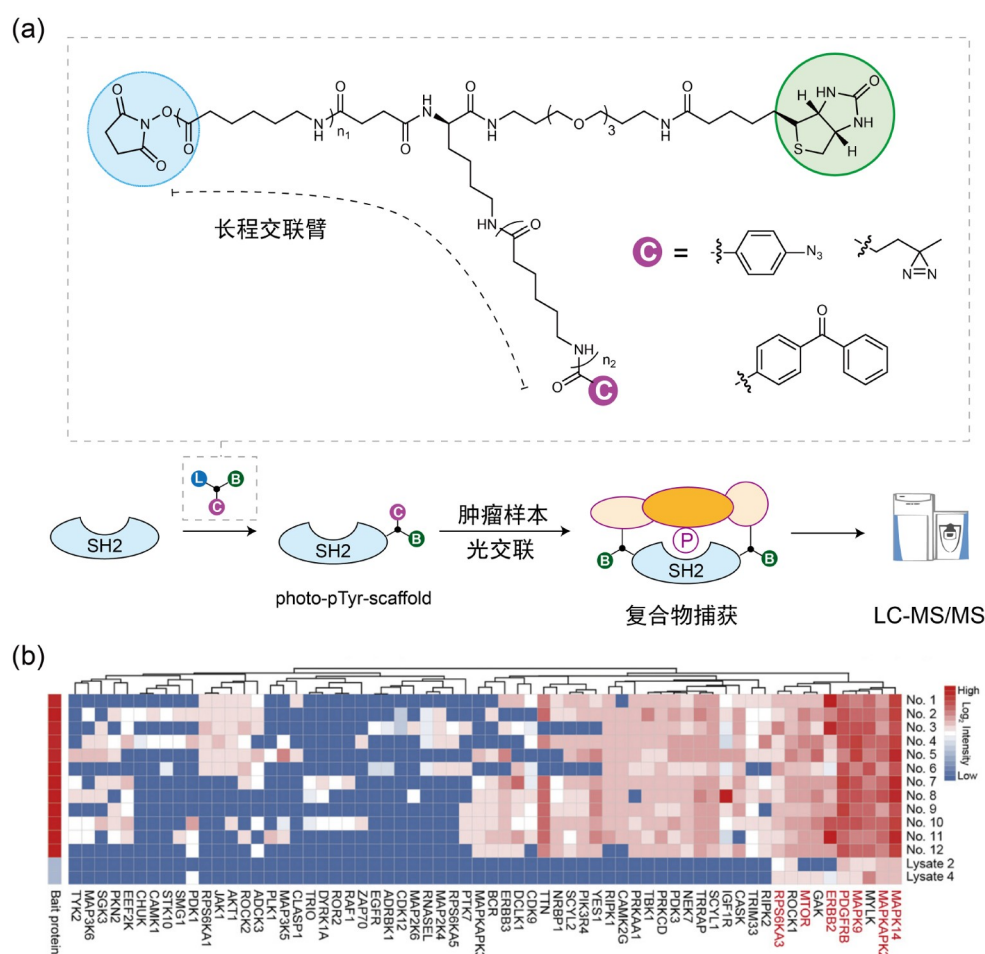
图3 (网络版彩图)捕获CD28膜受体蛋白质机器。(a) CD28交联探针的结构。(b) CD28膜内区复合物捕获的工作流程。(c) 通过光交联蛋白质组学或标准AP-MS鉴定的PpYAPP基序相互作用组^[15]

Figure 3 (Color online) Capturing the membrane receptor protein machinery of CD28. (a) Structure of CD28 crosslinking probe. (b) Workflow of capturing intercellular protein complex of CD28. (c) Interactome of PpYAPP motif identified by photo-crosslinking proteomics and standard AP-MS^[15].

检测异常的磷酸化信号通路,但这些方法无法全面反映动态磷酸化酪氨酸信号复合物在癌症信号转导中的作用.使用蛋白质复合物作为生物标志物,指示癌症状态和治疗反应的潜力尚未被充分挖掘.然而,在肿瘤样本中对磷酸化酪氨酸蛋白质复合物进行无偏分析极具挑战性.尽管人类蛋白质组中存在120多种不同的SH2结构域,它们对磷酸化酪氨酸基序有天然的亲和力,并且已被用于探测细胞或组织裂解物中的磷酸化酪氨酸蛋白质,但这些方法在复杂生物样品研究中的应用受到限制.

为了克服这些限制,课题组设计了兼具蛋白质结合、交联以及富集的三功能小分子探针,并将其与改

造的SH2结构域^[16]组装成蛋白质-探针偶联物,称为photo-pTyr-scaffold^[17].这种方法利用了光反应的优势,可以在温和的紫外线下共价捕获细胞中的磷酸化酪氨酸蛋白质复合物,而不需要基因操作的特性使其可以直接应用于临床相关的肿瘤样本(图4).使用该方法在细胞水平上表征表皮生长因子(EGF)激活的磷酸化蛋白质复合物,在BT-474和MDA-MB-468细胞系中分别鉴定到了人类表皮生长因子受体2 (HER2)和表皮生长因子受体(EGFR)驱动的信号转导复合物.进一步地在HER2阳性的乳腺癌样本的中,成功鉴定到了716个被显著富集的蛋白,其中包括64个蛋白激酶,并意外地发现血小板衍生生长因子受体 β (PDGFRB)信号在所



有样本中均有上调现象. 进一步的研究表明, PDGFRB信号的上调源于成纤维细胞, 即PDGFR-PDGFRB的信号转导过程活跃在乳腺癌的肿瘤微环境中. 这一发现指导了PDGFR抑制剂crenolanib在乳腺癌模型小鼠上的应用, 展现出了高效的抑制肿瘤活性, 揭示了PDGFRB作为乳腺癌治疗靶点的可能性^[17].

4 受体膜内区蛋白质机器动态变化的表征

在信号转导过程中, 受体膜内区蛋白质机器处于高度动态变化的状态, 其组成能在数分钟内发生显著变化^[18]. 基于AP-MS的方法被大量用于受体膜内区蛋白质机器的研究, 一些经典的工作建立起了基本的基于酪氨酸磷酸化的蛋白质相互作用网络. 例如, Mann课题组^[19]在2005年精准表征了EGFR的各个磷酸化位点介导的蛋白质相互作用; Pawson课题组^[18]在2013年, 描绘了在EGFR激活后, 核心支架蛋白质SHC1的磷酸化位点在不同时间所介导的不同信号通路; Olsen课题组^[20]在2019年将这个相互作用网络拓展至整个EGFR受体蛋白质机器. 在此基础上, 更加精细、规模更大的AP-MS方法有望为受体膜内区蛋白质机器的研究提供更加贴近真实细胞体系的、更为完整的蛋白质相互作用网络. 而面向活细胞内蛋白质机器的质谱方法也能为体外的相互作用数据提供在活细胞内动态变化的注解.

4.1 信号转导过程的动态蛋白质机器

近年来, 邻近标记技术因其能够特异性标记活细胞中靶蛋白邻近的大约10 nm半径范围内的蛋白质, 已被广泛用于在蛋白质组的水平研究蛋白质复合物. 尽管经典的邻近标记技术BioID已经在稳定的蛋白质复合物研究中发挥了重要价值, 但其需要12~24 h才能获得足够的标记信号, 这限制了其在动态蛋白质复合物研究中的应用^[21,22]. 为了克服这一限制, TurboID技术应运而生, 它基于BioID发展而来, 能在短短10 min内实现生物素标记, 使得研究者能够探索更为动态的蛋白质复合物^[23]. 与此同时, 基于抗坏血酸过氧化物酶(APEX)的邻近标记技术也在亚细胞结构蛋白质组研究中得到了广泛应用^[24]. 与BioID和TurboID相比, APEX酶在双氧水存在时, 能迅速生成生物素-苯酚自由基, 并在不到1 min的时间内完成蛋白质标记, 为探

索具有高时空分辨率的动态蛋白质机器提供了可能. 然而, 基于APEX的邻近蛋白质组学方法因其较大的标记半径, 存在标记背景过高的问题, 因此在探索时空特异的动态蛋白质机器方面仍面临挑战.

课题组设计并合成了一系列生物素-苯酚类似物, 通过调整苯酚上取代基调节酚羟基的电子密度或使用苯胺替代苯酚, 使自由基中间体能够形成聚合物, “淬灭”活性自由基, 实现降低标记半径的目的. 通过考察12种生物素-苯酚类似物的自由基生成与淬灭特性, 发现了能够更选择性地标记邻近蛋白质上的酪氨酸残基的探针BP5和BN2 (图5). 在整合素连接激酶(ILK)稳定复合物和EGF刺激下的GRB2动态复合物的表征中, BP5和BN2因其更高的胞质蛋白质复合物标记特异性而脱颖而出. 利用这两个探针开发了邻近蛋白质组学方法, 此研究探索了接头蛋白T细胞受体信号抑制因子1 (STS1)在EGF刺激下的动态相互作用组, 实现了分钟级的时间分辨率. 与传统的AP-MS技术相比, 高选择性的邻近标记技术不仅能够呈现相似的时间动态曲线, 而且对信号转导复合物中的较弱的瞬时相互作用有良好的覆盖能力. 此研究证明了基于生物素-苯酚探针BP5和BN2的邻近标记技术, 可以实现活细胞中以分钟级的时间分辨率探索动态受体蛋白质机器的相互作用组^[25].

通过结合基于BP5的分钟分辨率邻近标记技术与基于SH2超亲体的pTyr肽富集技术, 发展了二维近程蛋白质组学策略, 实现从同一亲和纯化样本中同时分析蛋白质复合物及其相关的pTyr位点^[26]. 利用此方法, 对EGF刺激后EGFR信号传导通路中以及内体中动态的pTyr信号复合物进行定量表征, 发现互作蛋白质和pTyr位点的时间依赖变化曲线紧密相关. 进一步结合靶向平行反应监测(PRM)-MS分析, 此研究实现了活细胞中蛋白质机器位点和复合物的同时时空动态表征, 为表征活细胞中pTyr介导的蛋白质复合物提供了高灵敏的分析手段.

4.2 在活细胞“脉冲-追踪”激酶的功能

膜受体蛋白质机器与下游的一系列蛋白通过复杂的转导通路及相互作用网络, 精细地调节蛋白质功能, 将细胞外部的信号转化为细胞响应. 包括膜受体在内的蛋白激酶作为这套复杂网络系统的核心, 通过磷酸化修饰、蛋白质机器组装, 完成生命体与活细胞内的

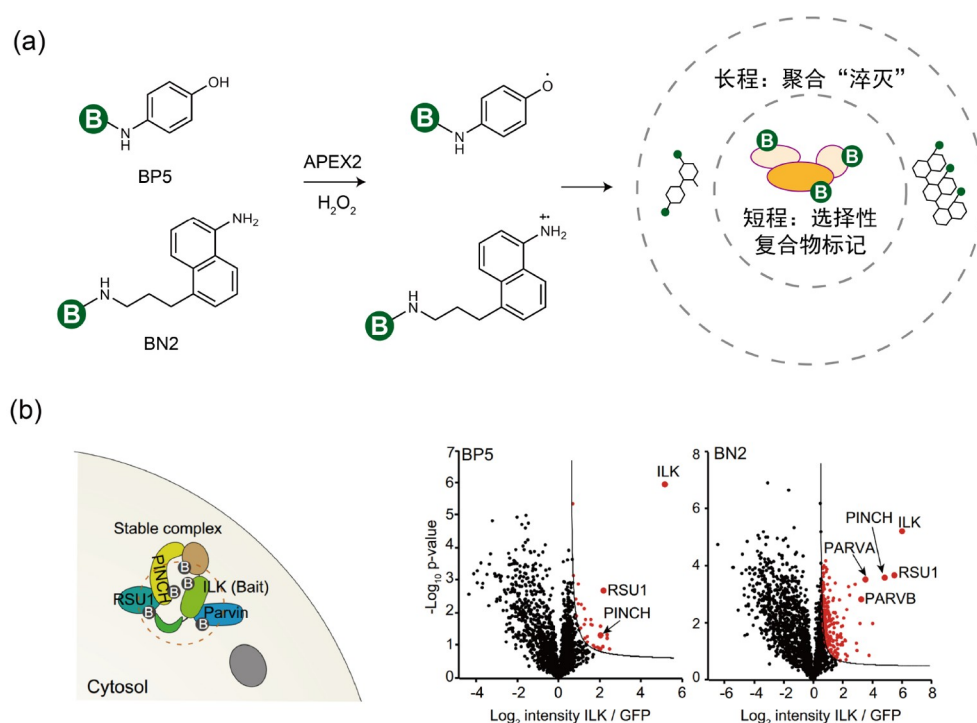


图 5 (网络版彩图) (a) BP5和BN2探针的化学结构及选择性复合物标记原理. (b) 利用ILK复合物对BP5和BN2的标记性能进行表征. 火山图展示的为邻近标记后的AP-MS结果^[25]

Figure 5 (Color online) (a) Chemical structures of BP5 and BN2 probes and the principle of specific labeling of the protein complex. (b) Characterization of labeling properties of BP5 and BN2 using ILK complex. Volcano plots indicating the AP-MS results after proximity labeling ^[25].

精准信息传递过程. 然而原位研究细胞中的磷酸化修饰需要面对活细胞中磷酸化高度动态、级联激活的挑战. 具体而言, 目标激酶难以在细胞中被精准地激活, 进而建立激酶活性调节-底物磷酸化变化的调控关系; 激酶激活后数秒到数分钟内产生的磷酸化级联信号需要依赖高时间分辨率的系统表征方法, 以解析不同磷酸化修饰信号的时序信息.

传统的基于刺激配体的研究方法受到只有少数激酶存在天然配体的限制, 而基于化学补救^[27]、光/化学遗传学^[28,29]等新兴方法的激酶激活技术难以同时实现方法的通用性和激酶天然功能的保留. 北京大学陈鹏课题组^[30,31]前期报道了一系列基于生物正交剪切反应的蛋白活性调控技术, 即通过对目标蛋白关键残基的保护-脱保护, 实现对其活性的原位“关-开”调控. 激酶催化口袋中的保守赖氨酸, 仅需使用生物正交剪切反应, 对赖氨酸侧链进行“保护-脱保护”, 即可实现可编程地操作目标激酶^[32]. 使用这种策略只需要对单个氨基酸残基进行操作, 尽可能地保留了激酶的天然活性,

能够更加真实地反应激酶在活细胞中的功能. 本课题组与陈鹏课题组合作, 结合了激酶瞬时激活方法与定量磷酸化蛋白质组学技术, 开发了激酶“脉冲追踪”技术DeKinomics^[34]. 课题组通过遗传密码子扩展技术将目标激酶的活性赖氨酸替换为光脱笼基团保护的赖氨酸衍生物ONPK, 使激酶的活性处于“关闭”状态; 利用ONP的快速光照脱保护反应, 释放赖氨酸的侧链氨基, 实现目标激酶的瞬时、特异的激活. 运用深度、定量的酪氨酸磷酸蛋白质组学技术, 描述激酶激活后下游磷酸化的高时间分辨信号转导图景(图6a). DeKinomics能够达到秒级的时间分辨率, 实现了直接底物与下游磷酸化信号的分辨. 在原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)的研究中, 秒级的时间分辨率能够区分直接底物和下游磷酸化不同的响应速度(图6b). 我们对快速响应的磷酸化位点进行了体外磷酸化测试, 发现泛素样修饰物活化酶-1 (UBA1), 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶11 (PTPN11)等蛋白质是SRC的新底物(图6c). 此研究证明了在DeKinomics的高时间分辨组学数据中筛

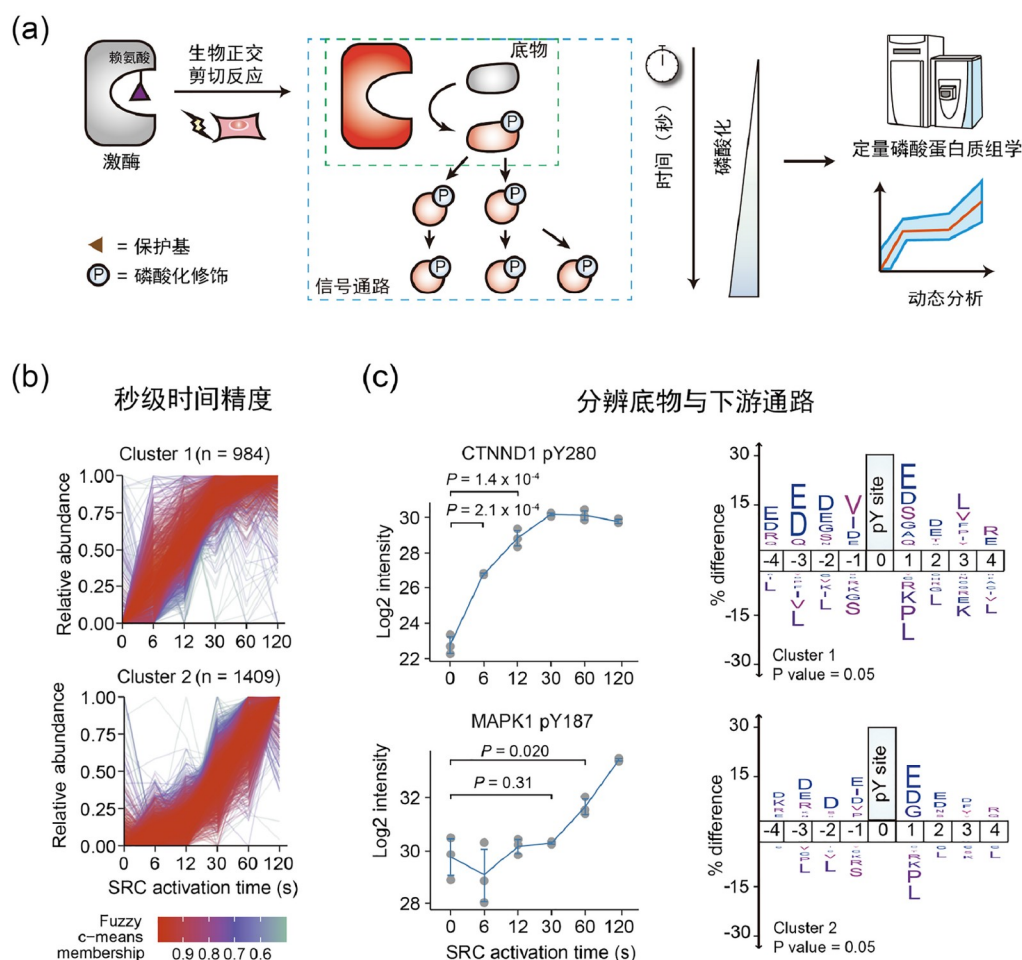


图6 (网络版彩图) (a) DeKinomics策略示意图. (b) SRC激酶的高时间分辨的DeKinomics研究. (c) DeKinomics能够分辨直接底物和下游磷酸化信号. CTNND1为SRC已报道底物, MAPK1为下游转导蛋白质^[34]

Figure 6 (Color online) (a) Schematic of DeKinomics strategy. (b) Highly time-resolved DeKinomics study of SRC kinase. (c) DeKinomics can distinguish the direct substrate from downstream phosphorylation. CTNND1 and MAPK1 are the direct substrate and the downstream signaling protein, respectively^[34].

选响应速度最快的磷酸化位点, 是挖掘激酶底物的可行策略. 相比于Kevan Shokat课题组发展的“凸凹互补”(bump-and-hole)技术和Benjamin Turk发展的多肽阵列技术, DeKinomics能够在活细胞的环境中建立激酶-底物关系, 为激酶底物的相关研究提供了具有生理相关性的注解. 进一步地, 此研究证明了DeKinomics是普适的激酶研究策略, 包括天然的丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶和疾病中的激酶变体. 此外, 泛素E1连接酶UBA1的Y55位点是此研究新发掘的SRC底物之一. 超过99%的泛素化修饰都是由UBA1活化^[33], 通过泛素E2-E3连接酶修饰到蛋白上. 此研究证明了UBA1的Y55位磷酸化修饰以抑制UBA1形成E1~Ub硫

酯中间体的机制来抑制UBA1的活性, 揭示了在修饰酶层面的泛素化和磷酸化的串扰(crosstalk)新机制^[34].

5 总结与展望

膜受体蛋白质机器是将胞外的细胞因子信号转换成细胞内的动态修饰信号的关键节点. 本课题组开发了一系列化学生物学与蛋白组学相结合的方法, 更加精准地描绘不同时空环境中的膜受体蛋白质机器(图7). 而且除了膜受体蛋白质机器以外, 如复合物介导的Wnt信号通路、应激压力下的核糖体动态组成、蛋白质相互作用介导的细胞间的通讯过程等, 这些新

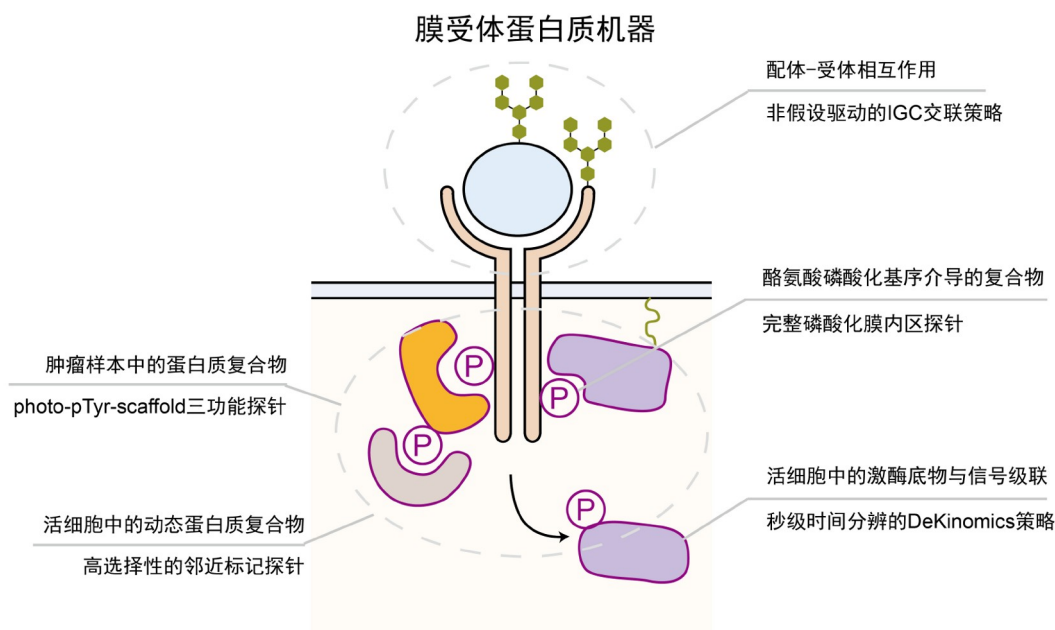


图 7 (网络版彩图) 近年研究工作总结

Figure 7 (Color online) Summary of research work in recent years.

方法也有潜力应用于这些精细的原位复合物调控研究。

伴随着近年来揭示的异常活跃的配体-受体膜受体蛋白质机器与肿瘤发生发展的关系, 癌细胞与周围的非癌细胞的协同共生的关系得到了进一步的理解, 肿瘤微环境中也逐渐成为癌症诊断与治疗的研究热点之一。由于细胞因子具有高活性、低丰度的特点, 在样品量受限的肿瘤样本中的全面表征要求分析技术具备极高的灵敏度。而精准、系统的配体-受体的相互作用对的鉴定有望提示更多的肿瘤微环境中可靶向的位点。此外, 肿瘤的异质性使得蛋白质在空间上的分布高度的不均匀, 将空间信息整合至蛋白质组, 可以进一步理解肿瘤-周质之间的相互连结关系。因此, 面向这个生物学过程的化学生物学技术, 如MultiMAP^[35]、Su-FEx^[36]等, 结合精准的组织激光切割技术和高回收率的集成化样品前处理技术, 可以提供生物过程、样品空间高度特异的蛋白质组学样品, 为解析膜受体蛋白质机器的参与的生理、病理过程提供前所未有的解析

精度。

尽管蛋白质-蛋白质相互作用、激酶-底物关系在体外研究层面有了系统层面的认知, 然而在活细胞乃至活体中膜受体蛋白质机器中的这些修饰与相互作用过程的时空动态性仍有待进一步的理解。近年来, 活细胞中的蛋白质功能扰动技术的出现使得在生理条件下逐个研究蛋白质空间定位和酶学功能成为可能^[37-40]; 不同标记半径的邻近标记技术展现了目标蛋白质的不同尺度空间信息: 从相互作用蛋白质、大型蛋白质复合体机器到亚细胞结构的定位^[10,41-44]。整合高时间分辨的多维度组学技术, 如磷酸化蛋白质组学、邻近标记组学, 有望剖析细胞如何在时空上协调蛋白质修饰和蛋白质相互作用, 并通过膜受体蛋白质机器调控细胞功能。发展在活体中的邻近标记等化学生物学技术, 并结合蛋白质组学技术在特定的生物学过程中捕获膜受体蛋白质机器的变化, 有望建立膜受体蛋白质机器和病毒免疫、营养摄取等更复杂生物功能之间的联系。

参考文献

- 1 Alberts B. *Cell*, 1998, 92: 291-294
- 2 Bludau I, Aebersold R. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 327-340

- 3 Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway BM, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T, Rad R, Pan J, Nusinow DP, Paulo JA, Schweppe DK, Vaites LP, Harper JW, Gygi SP. *Cell*, 2021, 184: 3022–3040.e28
- 4 Salas D, Stacey RG, Akinlaja M, Foster LJ. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19: 1–10
- 5 Prabhu N, Dai L, Nordlund P. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 54: 54–62
- 6 Qin W, Cho KF, Cavanagh PE, Ting AY. *Nat Methods*, 2021, 18: 133–143
- 7 Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 4266–4276
- 8 Mahadevan D, Von Hoff DD. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 1186–1197
- 9 Sobotzki N, Schafroth MA, Rudnicka A, Koetemann A, Marty F, Goetze S, Yamauchi Y, Carreira EM, Wollscheid B. *Nat Commun*, 2018, 9: 1519
- 10 Geri JB, Oakley JV, Reyes-Robles T, Wang T, McCarver SJ, White CH, Rodriguez-Rivera FP, Parker Jr. DL, Hett EC, Fadeyi OO, Oslund RC, MacMillan DWC. *Science*, 2020, 367: 1091–1097
- 11 Zheng J, Zheng Z, Fu C, Weng Y, He A, Ye X, Gao W, Tian R. *Nat Commun*, 2023, 14: 4138
- 12 Hunter T. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21: 140–146
- 13 Pawson T. *Cell*, 2004, 116: 191–203
- 14 Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. *Immunity*, 2016, 44: 973–988
- 15 Chen X, Ji S, Liu Z, Yuan X, Xu C, Qi R, He A, Zhao H, Song H, Xiao C, Gao W, Chen PR, Luo R, Li P, Wang F, Yang X, Tian R. *Cell Chem Biol*, 2022, 29: 1024–1036.e5
- 16 Kaneko T, Huang H, Cao X, Li X, Li C, Voss C, Sidhu SS, Li SSC. *Sci Signal*, 2012, 5: ra68
- 17 Chu B, He A, Tian Y, He W, Chen P, Hu J, Xu R, Zhou W, Zhang M, Yang P, Li SSC, Sun Y, Hunter T, Tian R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E8863–E8872
- 18 Zheng Y, Zhang C, Croucher DR, Soliman MA, St-Denis N, Pasulescu A, Taylor L, Tate SA, Hardy WR, Colwill K, Dai AY, Bagshaw R, Dennis JW, Gingras AC, Daly RJ, Pawson T. *Nature*, 2013, 499: 166–171
- 19 Schulze WX, Deng L, Mann M. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005.0008
- 20 Lundby A, Franciosa G, Emdal KB, Refsgaard JC, Gnosa SP, Bekker-Jensen DB, Secher A, Maurya SR, Paul I, Mendez BL, Kelstrup CD, Francavilla C, Kveiborg M, Montoya G, Jensen LJ, Olsen JV. *Cell*, 2019, 179: 543–560.e26
- 21 Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. *J Cell Biol*, 2012, 196: 801–810
- 22 Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Kc B, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux KJ. *Mol Biol Cell*, 2016, 27: 1188–1196
- 23 Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, Feldman JL, Perrimon N, Ting AY. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 880–887
- 24 Rhee HW, Zou P, Udeshi ND, Martell JD, Mootha VK, Carr SA, Ting AY. *Science*, 2013, 339: 1328–1331
- 25 Ke M, Yuan X, He A, Yu P, Chen W, Shi Y, Hunter T, Zou P, Tian R. *Nat Commun*, 2021, 12: 71
- 26 Kong Q, Ke M, Weng Y, Qin Y, He A, Li P, Cai Z, Tian R. *J Proteome Res*, 2022, 21: 2727–2735
- 27 Qiao Y, Molina H, Pandey A, Zhang J, Cole PA. *Science*, 2006, 311: 1293–1297
- 28 Zhou XX, Fan LZ, Li P, Shen K, Lin MZ. *Science*, 2017, 355: 836–842
- 29 Karginov AV, Ding F, Kota P, Dokholyan NV, Hahn KM. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 743–747
- 30 Li J, Chen PR. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 129–137
- 31 Wang J, Liu Y, Liu Y, Zheng S, Wang X, Zhao J, Yang F, Zhang G, Wang C, Chen PR. *Nature*, 2019, 569: 509–513
- 32 Zhang G, Li J, Xie R, Fan X, Liu Y, Zheng S, Ge Y, Chen PR. *ACS Cent Sci*, 2016, 2: 325–331
- 33 Barghout SH, Schimmer AD, Barker E. *Pharmacol Rev*, 2021, 73: 1–56
- 34 Weng Y, Chen W, Kong Q, Wang R, Zeng R, He A, Liu Y, Mao Y, Qin Y, Ngai WSC, Zhang H, Ke M, Wang J, Tian R, Chen PR. *Nat Chem Biol*, 2024, 20: 615–623
- 35 Lin Z, Schaefer K, Lui I, Yao Z, Fossati A, Swaney DL, Palar A, Sali A, Wells JA. *Science*, 2024, 385: ead15763
- 36 Li Q, Chen Q, Klauser PC, Li M, Zheng F, Wang N, Li X, Zhang Q, Fu X, Wang Q, Xu Y, Wang L. *Cell*, 2020, 182: 85–97.e16
- 37 Li J, Yu J, Zhao J, Wang J, Zheng S, Lin S, Chen L, Yang M, Jia S, Zhang X, Chen PR. *Nat Chem*, 2014, 6: 352–361
- 38 Lee G, Muir TW. *Nat Chem Biol*, 2024, 20: 1353–1360
- 39 Li J, Jia S, Chen PR. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 1003–1005

- 40 Liu Y, Zeng R, Wang R, Weng Y, Wang R, Zou P, Chen PR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2025299118
- 41 Seath CP, Burton AJ, Sun X, Lee G, Kleiner RE, MacMillan DWC, Muir TW. *Nature*, 2023, 616: 574–580
- 42 Pan C, Knutson SD, Huth SW, MacMillan DWC. *Nat Chem Biol*, 2025, 21: 490–500
- 43 Liu Z, Xie X, Huang Z, Lin F, Liu S, Chen Z, Qin S, Fan X, Chen PR. *Chem*, 2022, 8: 2179–2191
- 44 Liu Z, Guo F, Zhu Y, Qin S, Hou Y, Guo H, Lin F, Chen PR, Fan X. *Nat Commun*, 2024, 15: 2712

Discovery and characterization of dynamic modifications of membrane receptor protein machinery

Yicheng Weng^{1,2†}, Jiangnan Zheng^{1†}, Ruijun Tian^{1*}

¹ Research Center for Chemical Biology and Omics Analysis, Department of Chemistry, School of Science, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China

² School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author (email: tianrj@sustech.edu.cn)

Abstract: Membrane receptor protein machinery regulates the assembly of protein complexes via dynamic post-translational modifications, enabling precise spatiotemporal control of cell phenotypes. Mass spectrometry-based proteomics has become a prevalent technique for analyzing these modifications and protein complexes. We reasoned that chemical biology tool could empower mass spectrometry-based proteomics to reveal tyrosine phosphorylation modifications and protein complexes of membrane receptor protein machinery in their native environments. By capturing and enriching interacting proteins with chemical probes, we identified ligand-receptor pairs and phosphorylation-mediated protein complexes in the tumor microenvironment and immune process. Additionally, by developing chemical biology tools in living cells, we depicted the dynamic protein complexes and phosphorylation cascades regulated by membrane receptor protein machinery under specific spatiotemporal conditions.

Keywords: membrane receptor protein machinery, proteomics, protein complex, tyrosine phosphorylation

doi: [10.1360/SSC-2024-0230](https://doi.org/10.1360/SSC-2024-0230)