

蛋白质的氧化重折叠

张渝英 杨开宇*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 经过近几十年来广泛而深入的研究, 蛋白质氧化重折叠的机制已得到相当详细的阐明。1. 在已研究过的蛋白质中, 大多数蛋白质都是沿着多途径而非单一、特定的途径进行氧化重折叠, 这与折叠能量景观学说是一致的。2. 正是氨基酸残基间的天然相互作用而不是非天然的相互作用控制蛋白质的折叠过程。这一结论与含非天然二硫键的折叠中间体在牛胰蛋白酶抑制剂 (BPTI) 折叠中所起的重要作用并非相互排斥, 因为后者仅仅是进行链内二硫键重排的化学反应所必需, 与控制肽链折叠无直接关系。3. 根据对 BPTI 的研究, 二硫键曾被认为仅仅具有稳定蛋白质天然结构的作用, 既不决定折叠途径也不决定其三维构象。这一观点不适用于其它蛋白质。对凝乳酶原的研究表明, 天然二硫键的形成是恢复天然构象的前提。天然二硫键的形成与肽键的正确折叠相辅相成, 更具有普遍意义。4. 在氧化重折叠的早期, 二硫键的形成基本上是一个随机过程, 随着肽链的折叠二硫键的形成越来越受折叠中间体构象的限制。提高重组蛋白质的复性产率是生物技术领域中的一个巨大的挑战。除了分子聚集外, 在折叠过程中所形成的二硫键错配分子是导致低复性率的另一个主要原因。氧化重折叠机制的阐明为解决此问题提供了有益的启示。如上所述, 在折叠的后期, 二硫键的形成决定于折叠中间体的构象, 类天然、有柔性的结构有利于天然二硫键形成和正确折叠, 具有这类结构的分子为有效的折叠中间体, 最终都能转变为天然产物, 而无效折叠中间体往往具有稳定的结构, 使巯基、二硫键内埋妨碍二硫键重排, 并因能垒的障碍不利于进一步折叠。因此, 降低无效折叠中间体的稳定性使之转变为有效折叠中间体是提高含二硫键蛋白质复性率的一条基本原则, 实验证明, 碱性 pH、低温、降低蛋白质稳定性的试剂、蛋白质二硫键异构酶、改变蛋白质一级结构是实现这一原则的有效手段。此外, 这里还就氧化重折叠的基础和应用研究的前景进行了讨论。

关键词 氧化重折叠, 复性率, 二硫键, 重组蛋白质

中图分类号 Q617 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)01-0001-08

蛋白质的氧化重折叠是一个二硫键形成与构象恢复相耦合的过程, 进行相关研究具有理论意义与实用价值: 1. 鉴定折叠中间体、揭示折叠途径是阐明蛋白质折叠规律的必由之路, 然而, 折叠中间体往往是瞬时即逝, 难以跟踪与获得, 但含二硫键的中间体可通过化学方法加以捕捉, 为研究带来了便利, 因此, 氧化重折叠便成为这一领域中基础研究的主题之一。2. 利用基因工程生产重组蛋白质的障碍之一是复性, 二硫键错配是导致复性率低的一个重要原因, 因此, 氧化重折叠的研究便成为生产重组蛋白质无法回避的问题。氧化重折叠的研究可追溯到 1961 年 Anfinsen 的先驱性工作, 而重组蛋白质的复性则始于 80 年代初基因工程的兴起。在此期间探讨的核心问题大体上可归纳如下:

● 控制折叠过程的氨基酸残基间的相互作用是否都存在于天然结构中? 非天然的残基间的相互作用(如非天然二

硫键)在折叠中是否也起重要作用?

● 是单一的折叠途径还是多元的折叠途径?

● 二硫键是否只起稳定蛋白质构象的作用而不决定折叠途径与构象?

● 提高含二硫键蛋白质复性率的关键是什么? 有无共同规律可循?

经过数十年的研究已取得了显著的进展, 为总结基本规律, 提出解决实际问题的基本原则提供了可能。本文将就这两方面结合实例加以论述。

1 蛋白质氧化重折叠的机制

在蛋白质氧化重折叠的研究中, 牛胰蛋白酶抑制剂 (BPTI)^① 与 RNase A 是了解得最深入的两个模型蛋白, 因此先从这两个蛋白开始, 并对有助于澄清上述争论的研究结果一并

收稿日期 2002-09-13, 修回日期 2002-11-05。

* 通讯作者。 Tel 86-10-62566527, Fax 86-10-62560912, E-mail: yangky@sun.im.ac.cn

① 本文采用以下缩写: BiP, immunoglobulin heavy chain binding protein; BPTI, bovine pancreatic trypsin inhibitor; CD, circular dichroism; EGF, epidermal growth factor; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor; PCI, potato carboxypeptidase inhibitor; PDI, protein disulfide isomerase; TAP, tick anticoagulant peptide; TPA, tissue plasminogen activator

加以介绍。

BPTI 有三对二硫键: C5-C55, C14-C38, C30-C51。Creighton^[1-3]实验室经过 20 年的研究提出了 BPTI 的折叠途径 (Fig. 1-1-a)。变性、还原的分子经过折叠首先形成具有一对二硫键的分子群,包括 15 种不同巯基配对的异构体,其中 (30-51)^① 和 (5-55) 较其它异构体稳定,故能积累。二者经过进一步氧化形成 4 种含两对二硫键的折叠中间体。其中两种各有一对非天然二硫键 (C5-C14 或 C5-C38), 具有部分折叠的构象: 部分肽链折叠成类天然构象, 而另一部分处于去折叠状态, 具有柔性^[1]。这种构象有利于巯基/二硫键交换反应, 通过链内二硫键重排形成 (30-51, 5-55)。(30-51, 5-55) 具有类天然构象, 巯基 C14 与 C38 处于分子表面, 彼此靠近, 容易氧化形成第 3 对二硫键, 完成氧化重折叠。另外两种折叠中间体 (30-51, 14-38) (5-55, 14-38) 含两对天然二硫键, 具有准天然构象 (Quasi-native conformation)^[4], 其特征是整体结构极似天然构象, 只是在缺少最后一对二硫键的局部区域有所不同, 这种构象过于稳定, 缺乏柔性, 进一步氧化与折叠需越过很大的能垒, 严格地说它们都属于无效的折叠中间体 (Unproductive intermediate)。(30-51, 14-38) 只有经过二硫键重排转变为上述含非天然二硫键的异构体, 才能再进入有效的折叠途径, 而 (5-55, 14-38) 除有能垒障碍外, 巯基 C30 与 C51 内埋, 难以氧化, 是一种无出路的中间体 (Dead-end intermediate)。由此可见, BPTI 沿着一条单一的、特异的途径进行折叠, 含非天然二硫键的折叠中间体在其中起决定性的作用。

Weissman 和 Kim^[5]对非天然二硫键在折叠中的重要性提出异议, 认为 Creighton 等采用了不恰当的捕捉、分离折叠中间体的方法, 检测到的含非天然二硫键的中间体超过实际存在的数量, 过高地估计了它们在折叠中的作用, 因而主张将这两种排除在外, 只保留具有天然二硫键的中间体 (Fig. 1-1-b), 并用以证明只有蛋白质天然结构中存在的氨基酸残基间的相互作用才在折叠中起控制作用。

事实上, Weissman 和 Kim 采用改进的方法仍能检测到含非天然二硫键的折叠中间体, 只是数量较少。Creighton 认为^[3]不能根据数量的多少来判断一个中间体重要与否, 无效中间体往往因不能转化而积累, 而有效中间体一旦形成便迅速转变为另一种中间体或产物, 反而不可能大量积累, 上述含非天然二硫键的中间体正属于后者。结构分析表明^[1], 它们与其前体 (30-51) 相比, 具有类似的部分折叠的构象, 非天然二硫键处于分子的柔性部分 (Fig. 2), 这说明它们的形成既未破坏原有的有序结构, 也未引入非天然构象, 因此不存在非天然二硫键控制肽链折叠的问题。它们对折叠的贡献在于其部分折叠的构象有利于分子内二硫键的重排以适应形成 (30-51, 5-55) 的化学反应的要求^[2]。事实上, Weissman 和 Kim^[6]也承认这两种非天然二硫键的出现是二硫键形成的化学反应的必然结果, 因为由 (30-51, 14-38) 转变为 (30-51, 5-55) 的第一步就是形成 C5-C14 或 C5-C38。

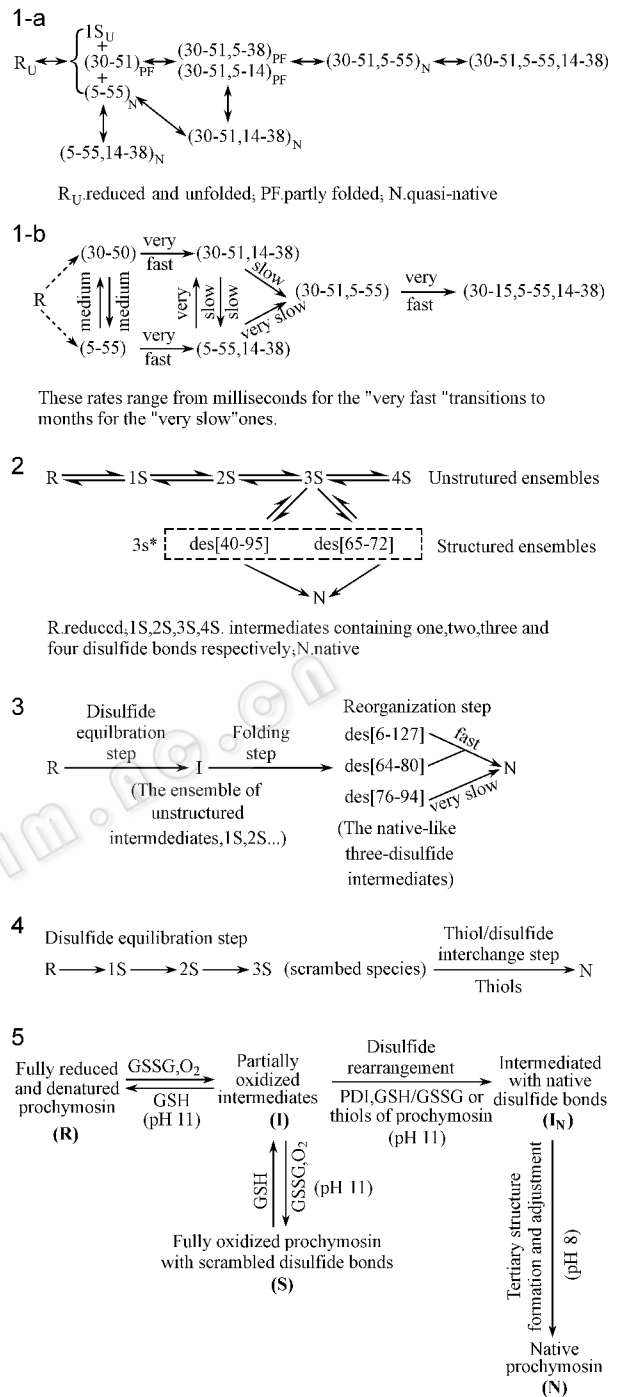


图 1 氧化重折叠途径

Fig. 1 The oxidative refolding pathways of (1-a) BPTI proposed by Creighton *et al.*^[1-3]; (1-b) BPTI proposed by Weissman and Kim^[5]; (2) RNase A^[7]; (3) Lysozyme^[8]; (4) Hirudin, PCI, EGF and TAP (illustrated based on the description of Ref. 9); (5) Prochymosin^[15]

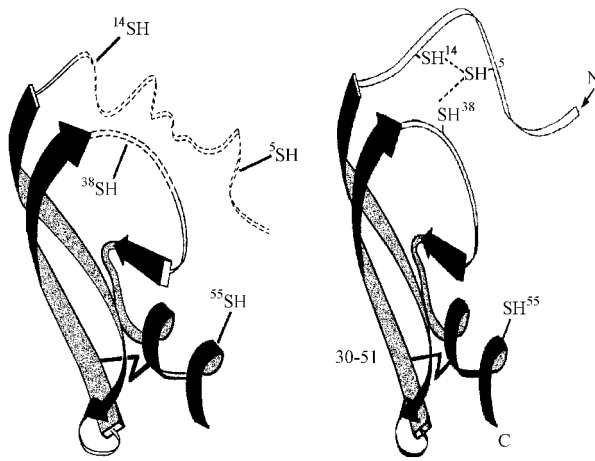


图2 BPTI 折叠中间体的构象

Fig.2 The partly folded conformations of (a) BPTI intermediate (30-51)^[4] and (b) BPTI intermediates (30-51 , 5-38) and (30-51 , 5-14)^[1]

综上所述,关于天然的和非天然的二硫键在蛋白质折叠中的作用可从两方面去认识,一般而言,只有天然二硫键才有引导正确折叠的作用,而非天然二硫键无此功能,但有些非天然二硫键有保持分子柔性的作用,是进行巯基/二硫键交换反应所必需,它们的存在只是瞬时的,满足二硫键化学的需要与控制折叠不是同一个概念。因此,二者并非绝对对立,彼此不相容。

RNase A 有 4 对二硫键: C26-C84, C58-C110, C40-C95, C65-C72。RNase A 的折叠模式^[7](Fig. 1(2))与 BPTI 相比既有共性也有区别。其共性是,在折叠的早期二硫键的形成也是一个随机的过程,在含一对二硫键的分子群(1S)中, 28 种可能的巯基组合均可检测到。1S 依次氧化成 2S、3S、4S, 它们也都是由多种二硫键异构体组成的分子群。在 3S 中通过链内二硫键重排形成两种折叠中间体: de[65-72]和 de[40-95]。它们都具有 3 对天然二硫键和类天然构象,只是分别缺少 C65-C72 和 C40-C95, 已形成的天然二硫键内埋于有序的结构中,可免于被还原或重排,而游离的巯基则外露,这种结构有利于进一步氧化折叠,一旦形成便转变为天然产物,类似于 BPTI 的(30-51, 5-55)。另外两个含 3 对天然二硫键的折叠中间体 de[26-84]和 de[58-110]类似于 BPTI 的(5-55, 14-38),巯基与二硫键内埋,难以进行氧化与重排,属于无效的折叠中间体。RNase A 与 BPTI 折叠的差异在于 (1)RNase A 所形成的折叠中间体大多结构松散(Unstructured),各种异构体稳定性相近,因而容易相互转化,形成由 1S 至 4S 包含众多异构体的分子群,而 BPTI 只有 7 种稳定的折叠中间体: 2 个含一对二硫键, 5 个含两对二硫键。(2)BPTI 只有一条折叠途径,而 RNase A 至少有两个平行的折叠途径,除 Fig. 1(2)所示外, de[65-72]和 de[40-95]也可以从 2S 经过氧化而产生,只是通过此途径产生的中间体数量较少,图中未做反映。

溶菌酶有 4 对二硫键: C6-C127, C30-C115, C64-C80, C76-

C94。其折叠过程可用 Fig. 1(3)中的 3 个步骤加以描述^[8]。第一步,在折叠的早期形成含有一对和两对二硫键的分子群(1S, 2S),由于各种异构体结构松散可以相互转化,故称之为二硫键平衡阶段。第二步,经过进一步折叠形成具有 3 对天然二硫键以及类天然构象的三种折叠中间体。第三步,经过结构调整形成天然产物。在第二步所产生的三种中间体中, de[76-94]的 C94 内埋,故难以进一步氧化折叠转变为天然产物,只有 de[6-127]和 de[64-80]为有效的折叠中间体,可以通过结构调整转变为有天然构象与活力的分子。

水蛭素、马铃薯凝乳酶抑制剂(PCI)、表皮生长因子(EGF)和蟬抗凝肽(TAP)都是具有 3 对二硫键、分子大小与 BPTI 相近的多肽。它们有类似的折叠模式^[9],可归纳为 Fig. 1(4)。折叠可分为两个阶段。第一阶段为二硫键平衡阶段,还原、变性分子经过折叠迅速形成 1S、2S 直至 3S 具有不同巯基配对的分子群,分子群内和分子群间均可相互转化。第二阶段为巯基/二硫键交换阶段, 3S 中二硫键错配的分子在巯基试剂存在的条件下经过二硫键重排形成天然产物。显而易见,这一折叠模式不同于 BPTI,更接近于 RNase A 和溶菌酶。

从以上 7 种蛋白质的折叠过程不难发现,多途径氧化重折叠更具有普遍性,而单一的折叠途径则属于特例。事实上,任何一种蛋白质在其氧化重折叠的初期都是通过多途径形成不同的异构体,随着进一步折叠结构越来越稳定,异构体的数目逐步收敛,只保留为数不多的中间体,再通过有效的折叠中间体最终转变为独一无二、能量最低、具有天然构象的功能蛋白。BPTI 所以能成为特例,在于其天然构象十分稳定。在折叠早期, 1S 的分子群中就出现具有类天然结构稳定分子(5-55)和(30-51),因而能迅速地进入特定的折叠途径。由此可见,单一途径和多途径折叠并非彼此不相容,而是因蛋白而异,都以各自结构为基础。

BPTI 的特殊折叠模式还引发了二硫键是否决定蛋白质的构象和折叠的争议。结构分析表明^[10-12],在 BPTI 的折叠中间体中(5-55)(5-55, 14-38)(30-51, 14-38)虽然只有一对或两对天然二硫键,但它们均具有准天然构象,说明三维结构是在全部天然二硫键形成之前通过氨基酸残基间非共价相互作用而获得的。Creighton 据此提出“二硫键不决定天然构象,只起稳定天然构象的作用”^[14]。Jaenicke 更进一步提出“二硫键有稳定蛋白质天然构象的作用,既不决定折叠途径也不决定三维结构”^[11, 13]。Scheraga 根据对 RNase A 的研究对上述论点提出异议^[14]。在 RNase A 的折叠过程中, 1S、2S 均为松散结构,只有形成 3 对天然二硫键之后才具有类天然构象,因而认为 BPTI 在未形成多数二硫键之前就已形成天然构象只是个别现象,对于多数蛋白质来说天然构象的形成与天然二硫键的形成应该是相互影响、相辅相成。由于氧化重折叠是氧化与折叠同时进行,难以分割,因此判断二者的因果关系有一定的困难。本实验室通过对凝乳酶原折叠的研究明确无误地证明二硫键对蛋白质的正确折叠起决定性作用。

凝乳酶原具有 3 对二硫键 :C45-C50 ,C206-C210 ,C250-C283。它不同于已报道的其它含二硫键的蛋白质,氧化重折叠不可能在同一个 pH 条件下完成,必须经过 pH 11 和 pH 8 两个阶段才能正确折叠。实验证明,二硫键的形成与重排主要发生在 pH 11 第一阶段,而三级结构的形成与调整则主要发生在 pH 8 第二阶段 (Fig. 1(5))。无论是自发的还是蛋白质二硫键异构酶(PDI)^[16]或 GSH/GSSG^[15]催化的巯基/二硫键交换反应都只能在 pH 11 的条件下有效地进行,而此时二级结构与三级结构仅分别恢复 50% 和 25%,必须再经过 pH 8 条件下的进一步折叠才能恢复三级结构,获得有活性的产物。由此可见,天然二硫键的形成是凝乳酶原获得天然构象的前提。定位突变还证明 C250-C283 对凝乳酶原的折叠至关重要,删除后完全不能复性^[17],而 C45-C50 或 C206-C210 的删除仅降低复性率^[18,19],说明不同的二硫键对折叠的贡献有所不同。

综上所述,蛋白质氧化重折叠的机制可从两个侧面去分析。1. 就二硫键的形成而言,其基本规律是:在满足二硫键形成的化学反应的条件下(如适当的电子受体、适当的 pH 以保证巯基处于解离状态等)还原、伸展的肽链在折叠的早期二硫键的形成基本上是一个随机的过程,只是在一级结构中距离较近^[20],或邻近有碱性氨基酸^[21]的两个巯基更容易氧化)因此形成不同巯基组合的分子群,各种异构体缺乏稳定的结构,相互转化,随着进一步的氧化与折叠,有序结构的增加,异构体数目逐渐收敛,此时二硫键的形成越来越受肽链构象的制约,只有那些有一定柔性的类天然构象才可使相关的巯基相互靠拢、正确取向,并有利于巯基/二硫键交换反应,从而促进天然二硫键的进一步形成,而那些使巯基、二硫键内埋或构成能垒障碍的构象则不利于进一步的氧化。2. 就天然构象的恢复而言,只有当一定数目天然二硫键形成后才会出现有序的天然构象,天然二硫键不仅能稳定这种有序结构,而且还有引导进一步氧化与折叠的作用。总之,正是氧化与折叠的协同作用才使还原、伸展的肽链迅速转变为功能蛋白。

2 提高含二硫键蛋白质的复性率的基本原则与策略

在有应用价值的蛋白质中,有相当一部分含有二硫键,如何通过氧化重折叠提高复性率是利用基因工程生产重组蛋白质的关键。经过多年研究,已有不少成功的范例,但普遍认为复性方法因蛋白而异,缺乏通用性。因此,已有的综述文章大多是各种实例的汇集,工艺条件的介绍多于理论的探讨^[22-24]。事实上,氧化重折叠机制的阐明已为提高复性率提供了理论基础,而理性的复性方法的确立正是对特定蛋白的折叠规律进行深入探讨的结果。综观已有的研究成果不难发现,无效折叠中间体的积累是复性率低的根本原因,而无效折叠中间体的构象特征是既有类天然结构,又有妨碍进一步氧化与折叠的空间位阻。因此,提高复性率的基本原则应该是创造条件使无效的折叠中间体转变为有效的折叠中间体,即在尽可能保留天然结构单元的基础上破坏空间位

阻。其具体的实施途径可归纳为:优化复性系统的 pH 与温度,添加降低蛋白质稳定性的试剂或催化蛋白质二硫键重排的折叠酶,改变肽链的一级结构等。下面将结合实例加以说明。需要指出的是,本文主题是氧化重折叠,因此未涉及到影响复性的另一重要问题——疏水相互作用所引起的分子聚集。

2.1 控制 pH

二硫键的形成往往经历巯基/二硫键交换反应,在此反应中巯基必须解离,以 S⁻ 形式存在,而半胱氨酸 pKa 值一般为 8.6,因此多数蛋白质的复性均在 pH 8~9 条件下进行。我们发现,凝乳酶原在此 pH 完全不能复性,必须先先在 pH 11 的系统中进行折叠,然后再转入 pH 8 继续折叠。经过这两个阶段,复性率可达 40%,加入 GSH/GSSG 或 PDI 后复性率进一步提高,可分别达到 60%^[15]和 90%^[16]。值得强调的是(1)GSH/GSSG 或 PDI 必须在第一阶段加入才有提高复性率的效果。(2)PDI 在 pH 11 相当不稳定,其半寿期仅为 45min,必须不断补充才能实现高复性率。(3)根据文献报道,PDI 作为折叠酶能帮助多种蛋白质氧化重折叠,最适 pH 为 7~8,从未超过 8.7。由此可见,凝乳酶原必须在 pH 11 条件下进行二硫键重排以保证天然二硫键的形成,这既非二硫键形成的化学反应的需要,也不是 PDI 特性所决定。合理的解释只能是,在此条件下凝乳酶原的构象有利于巯基/二硫键的交换反应和天然二硫键的形成。CD 和荧光光谱分析证实,此时凝乳酶原的构象为松散结构,而在 pH 8 条件下,二级、三级结构都接近天然态。再次证明,决定氧化重折叠效率或复性率的关键是折叠后期肽链的构象。

免疫球蛋白^[25]、pA^[26]、胰岛素原^[27,28]和猪生长激素^[29]的复性 pH 分别为 10.8、10.5 和 9~11,采用高 pH 的原因未见报道,考虑到它们都是含二硫键的蛋白质,是否与强碱性条件有利于保持肽链的柔性构象有关是一个值得探讨的问题。

鼠朊病毒的蛋白结构域(23-231)^[30](Murine prion protein domain, mPr(23-231))是一个比较特殊的蛋白,虽然只有一对二硫键,但难以复性,必须在酸性条件下进行,当 pH 为 8 时复性率小于 5%,而在 pH 4 时复性率可达 56%。这是因为还原变性分子仍维持刚性结构,妨碍巯基靠拢形成二硫键,而酸性条件可使肽链具有柔性、降低能垒,从而促进氧化重折叠。需要说明的是,该复性系统利用 O₂ 作为电子受体,而 mPr(23-231)又只有一对二硫键,二硫键的形成不涉及到巯基的化学反应性,因此,低于半胱氨酸巯基 pKa 值时仍能有效地进行氧化重折叠。在酸性条件下进行氧化重折叠虽不具有普遍意义,但提供另一个例证说明折叠过程中肽链的构象决定复性效率。

2.2 控制温度

卵转铁蛋白分子量为 78k,含有 15 对二硫键,N-端和 C-端半分子各有一个与铁结合的位点,通常难以复性。但是经过不同温度的两个阶段,全分子和半分子均可恢复天然构象,形成天然二硫键,获得与铁结合的能力^[31]。第一阶段复

性在 0℃, GSH 存在的条件下进行, 进入第二阶段温度升至 22℃, 并加入 GSSG。第一阶段只有肽链的折叠而无巯基的氧化, 第二阶段氧化与折叠并进。实验证明, 经过第一阶段, 肽链具有部分折叠的构象, 二级结构类似天然态, 但随温度的变化而波动, 说明这种构象具有柔性, 先在低温中折叠可减少错配二硫键和由疏水相互作用所产生的分子聚集。

2.3 添加降低蛋白质稳定性的试剂 (Labilizing agent)

L-精氨酸、非变性浓度的盐酸胍 (GdmCl) 和尿素都属于可降低蛋白质稳定性的试剂, 有提高蛋白质复性率的作用。0.5~0.6mol/L 或 0.4mol/L L-精氨酸可使免疫毒素^[32]与 Fab^[33]的复性率分别提高 5 倍和 2.5 倍。当溶菌酶高达 5 mg/ml 时, 加入 1.75mol/L GdmCl, 复性率可达 80%。2mol/L 和 3.5mol/L 尿素对溶菌酶^[34]和猪生长激素^[29]的复性都有促进作用。它们的功能有两个方面, 一是与去折叠分子或折叠中间体的疏水区域相结合, 从而阻止分子聚集; 另一方面是降低折叠中间体的稳定性, 改变其刚性结构, 从而有利于巯基/二硫键交换反应。添加这类试剂必须确定适当浓度, 以期既能有效地提高中间体构象的柔性, 又不致使整个分子去折叠, 破坏已形成的天然结构。

2.4 添加催化蛋白质二硫键重排的折叠酶

在这类折叠酶中应用最多的是 PDI, PDI 通过纠正错配二硫键提高底物蛋白的复性率已有许多报道, 无需一一列举, 这里着重讨论底物蛋白的构象对 PDI 发挥功能的影响, Weissman 和 Kim 发现^[35], PDI 可使 BPTI 的两种具有准天然构象的折叠中间体转变为天然产物的速度分别提高 3500 和 6000 倍, 而对有效折叠中间体的作用仅达到中等水平, 因此提出 PDI 不但具有催化蛋白质二硫键重排的功能, 而且还能使底物蛋白的局部结构去折叠。我们发现, PDI 不是和任何一种蛋白结合都可通过去折叠改变底物的构象达到有利于天然二硫键形成的状态, 凝乳酶原就是一例^[16]。在 pH 8~9, PDI 对凝乳酶原复性无促进作用, pH 11 才是最适条件。实验证明, PDI 催化的反应与凝乳酶原的自发折叠具有相同的 pH 依赖关系。鉴于高 pH 可使凝乳酶原具有松散的结构, 因此有理由认为, 正是这种结构是 PDI 发挥功能的基础, PDI 催化的反应与自发折叠要求同样的底物构象更符合酶的催化原理。必须指出, 这一事实与 PDI 具有去折叠的功能并不一定相互排斥。因为 PDI 与底物蛋白结合以及所具有的还原二硫键的作用都可能引起底物局部去折叠, 但因底物蛋白不同, 所引发的结构改变未必都有利于正确的氧化重折叠, 因此对有些蛋白还需要其它因素协同配合, 高 pH 就是 PDI 帮助凝乳酶原折叠不可缺少的一个条件。

与此相类似, 单独 PDI 帮助 Fab 复性的效率不高^[36], 只能达到 20%, 而且只是在开始折叠的几秒钟内发挥作用, 折叠后 30 s 加入无促进作用, 这很可能是随着肽链的折叠所形成的构象使巯基内埋, 妨碍 PDI 发挥作用。加入结合蛋白 (BiP) 可使复性率达到 50%。实验证明, BiP 与 PDI 同时结合到 Fab, 可阻止巯基迅速内埋, 便于 PDI 催化二硫键重排, 延长其发挥作用的时间。

甲状腺球蛋白的单体分子的质量为 330kD, 含有 110 个巯基, 其活性形式为二聚体, 无链间二硫键。在体内合成过程中, 形成分子间交联的四聚体或更大的多聚体, 以此多聚体为起始分子进行复性, 其难度之大可想而知。但 BiP 与 PDI 的协同作用可提高复性率^[37], 这是因为 BiP 可以结合到多聚体上, 结合后有利于 PDI 还原链间二硫键, 促进正确折叠的二聚体形成。

2.5 改变蛋白质的一级结构

类胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 有 3 对二硫键: C6-C48, C18-C61, C47-C52, 是一个比较特殊的蛋白^[38-39], 无论在空气中还是在不同浓度的 GSH/GSSG 系统中进行氧化重折叠均不能全部转变为具有 3 对天然二硫键的产物 (N), 总是产生恒定比例的具有两对错配二硫键的异构体 [C6-C47, C18-C61, C48-C52 (M)]。分离纯化 M 再进行氧化重折叠仍然获得恒定比例的 N 与 M, 表明 N 与 M 有相同的自由能。这一结果有悖于 Anfinsen 的论点: 天然蛋白质在生理条件下处于最低自由能状态, 因此, 曾被称之为非 Anfinsen 折叠行为, 进而推测这两种形式在体内均可能存在, 以适应不同的生理要求。定位突变将 D3 改变为 G3 或 R3, 可使 N 的产率由 45% 提高到 85%^[40]。结构分析表明^[41] M 分子中 D3 与 R56 所形成的盐键有稳定两个错配二硫键的作用, 突变后破坏此盐键, 从而阻止错配二硫键的形成, M 的减少导致 N 相应地增加。

利用定位突变提高复性率从理论上讲是一个合理的途径, 但必须建立在结构知识的基础上, 特别是了解折叠中间体的结构更加困难, 因此在实践中有相当的难度。

在体内, 生物合成的肽链中除成熟蛋白序列外, 可能有一段原肽 (Pro-peptide), 它的存在可能会提高氧化重折叠的效率。例如, BPTI 原肽中的 Cys 可作为分子内的巯基试剂促进天然二硫键的形成^[42], 神经生长因子 (NGF) 的原肽有帮助氧化重折叠的作用, NGF 的复性率为 0.5%, 而 Pro-NGF 的复性率可达 35%^[43]。类似的例子还有不少, 在此不一一列举。因此, 比较有无原肽的蛋白质的复性特点是改变蛋白质一级结构提高复性率的简便易行的途径。

3 展 望

如上所述, 关于蛋白质氧化重折叠的机制目前已了解得相当透彻。但以往研究的模型蛋白大多是小分子、单链多肽, 今后的研究重点将会转向大分子、多亚基、既有链内二硫键又有链间二硫键的蛋白质。

80 年代后期以来对于分子伴侣在蛋白质正确折叠中的作用越来越有深刻的认识, 因此研究蛋白质折叠就必须考虑分子伴侣。前面提到的 Fab 和甲状腺球蛋白的氧化重折叠不但需要 PDI 的参与, 而且还需要 BiP 的帮助就是明显的例证。分子伴侣是根据其功能界定的, 并非某一特定的蛋白, 新发现的分子伴侣正在日益增加, 鉴于新生肽链是在细胞内不同间隔区域内折叠的, 每种蛋白都可能有其相对应的分子伴侣, 因此提出了二者共进化的观点^[44]。由此可以想象, 在生物进化中所确定的蛋白质一级结构所具有自我折叠成功

能蛋白的倾向必然会与其相对应的分子伴侣相适应。因此,在破译折叠密码时不但要考虑肽链本身氨基酸残基间的相互作用,还应考虑到肽链与其相对应的分子伴侣间的相互作用,这将使本已十分复杂的问题变得更加复杂。

多年来,在蛋白质折叠的研究中一直存在着热力学控制与动力学控制的争论。近年来提出的多维能量景观(Multidimensional energy landscape)学说或折叠漏斗(Folding funnel)^[45, 46](Fig. 3)较好地解决了这一矛盾^[47]。其基本点是:去折叠分子是一组具有不同结构状态的分子群,在折叠过程中各个分子沿着各自途径进行折叠,不存在单一的、特异的折叠途径。在折叠早期,去折叠分子结构松散、自由能大、可选择的构象自由度(即构象熵,Conformational entropy)也大。随着折叠,所形成的构象越来越稳定即自由能越来越小,构象熵也越来越小,折叠中间体数目不断减少,最终形成自由能最小、独一无二的天然构象,这一系列逐步收敛的变化呈漏斗状。就各个分子而言,由于折叠起始分子的结构不均一性,折叠前期次级键、共价键形成的随机性以及环境的影响,在折叠开始阶段各个分子所形成的构象也会有所不同。当有些构象有利于进一步正确折叠时,凡具有这些构象的分子都会顺利地转变为天然产物,如图3所示,它们的折叠过程可以形象地以自上而下的直线加以描述,上部表示自由能大,下部代表自由能小;另一些构象不利于进一步折叠,但可通过结构调整重新进行有效折叠,最终仍能转变为天然产物,其对应的能量变化可用起伏的曲线来表示,第三类为结构无法调整的错误的折叠的中间体或终产物。根据前两节的介绍,蛋白质氧化重折叠的过程与此模型基本吻合。可以预计,今后的研究将会用这一模型去分析实验结果,而所得到的实验结果又会丰富完善这一模型。

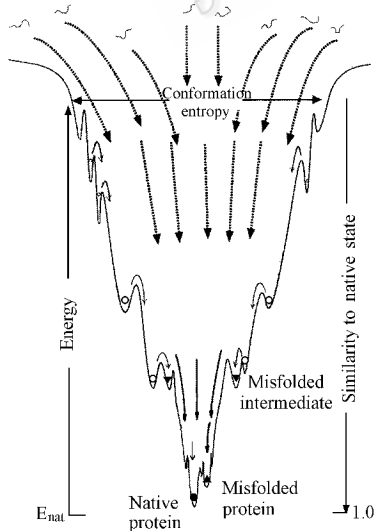


图3 蛋白质折叠能量景观图解(根据文献^[45] [46])

Fig. 3 A schematic representation of the folding energy landscape of a protein (adapted from Refs [45] [46])

- Intermediate ; ▼ Misfolded intermediate ;
▲ Misfolded protein ● Native protein

提高含二硫键蛋白质的复性率提供了基本原则,这是建立理性的复性方法的基础,今后将会不断深化。毋庸讳言,实验室的研究结果不一定都具有实用价值,在此基础上制定具有经济效益的方法仍待进一步努力。最后提一提复性方法的通用性问题。生物多样性决定了蛋白质折叠既有共同规律可循,又有各自的特点,因此只能通过广泛而深入的研究获得更有指导意义的原则,从而减少盲目性,而不大可能有一个普遍实用的方法。

REFERENCES (参考文献)

- [1] van Mierlo C P M, Kemink J, Neuhaus D *et al.* ¹H-NMR analysis of the conformational properties of the partially-folded non-native two-disulphide bonded intermediates (30-51, 5-14) and (30-51, 5-38) in the disulphide folding pathway of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol*, 1994, **235**: 1044 - 1061
- [2] Darby N J, Morin P E, Talbo G, Creighton T E. Refolding of bovine pancreatic trypsin inhibitor via non-native disulphide intermediates. *J Mol Biol*, 1995, **249**: 463 - 477
- [3] Creighton T E, Zapum A, Darby N J. Mechanisms and catalysis of disulphide bond formation in proteins. *TIBTECH*, 1995, **13**: 18 - 23
- [4] Creighton T E, Darby N J, Kemink J. The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J*, 1996, **10**: 110 - 118
- [5] Weissman J S, Kim P S. Reexamination of the folding of BPTI: predominance of native intermediates. *Science*, 1991, **253**: 1386 - 1393
- [6] Weissman J S, Kim P S. Kinetic role of nonnative species in the folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 9900 - 9904
- [7] Wedemeyer W J, Welker E, Narayan M *et al.* Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, 2000, **39**: 4207 - 4216
- [8] van den Berg B, Chung E W, Robinson C V *et al.* The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *EMBO J*, 1999, **18**: 4794 - 4803
- [9] Chang J Y, Li L, Bulychiev A. The underlying mechanism for the diversity of disulfide folding pathways. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 8287 - 8289
- [10] Eigenbrot C, Randal M, Kossiakof A A. Structural effects induced by the removal of a disulfide bridge: the X-ray structure of the C30A/C51A mutant of basic pancreatic trypsin inhibitor at 1.6 Å. *Protein Eng*, 1990, **3**: 591 - 598
- [11] van Mierlo C P M, Darby N J, Neuhaus D *et al.* The 14-35, 30-51 double-disulphide intermediate in folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor: a two-dimensional ¹H NMR study. *J Mol Biol*, 1991, **222**: 353 - 371
- [12] van Mierlo C P M, Darby N J, Neuhaus D *et al.* Two-dimensional ¹H NMR study of single-disulphide folding intermediate of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol*, 1991, **222**: 373 - 390
- [13] Jaenicke R, Buchner J. Protein folding: from "unboiling an egg" to "catalysis of folding". *Chemtracts—Biochemistry and Molecular Biology*, 1993, **4**: 1 - 30
- [14] Rothway D M, Scheraga H A. Generation of bovine pancreatic trypsin inhibitor disulfide isomerase. *Biochemistry*, 1993, **32**: 3200 - 3204

- 2671 – 2679
- [15] Wei C , Tang B , Zhang Y , Yang K . Oxidative refolding of recombinant prochymosin . *Biochem J* , 1999 , **340** :345 – 351
- [16] Tang B , Zhang S , Yang K . Assisted refolding of recombinant prochymosin with the aid of protein disulphide isomerase . *Biochem J* , 1994 , **301** :17 – 20
- [17] Huang K , Zhang Z , Liu N *et al.* Functional implication of disulfide bond , Cys250-Cys283 , in bovine chymosin . *Biochem Biophys Res Commun* , 1992 , **187** :692 – 696
- [18] Zhang Y , Li H , Wu H *et al.* Functional implications of disulfide bond , Cys45-Cys50 , in recombinant prochymosin . *Biochem Biophys Acta* , 1997 , **1343** :278 – 286
- [19] Chen H , Zhang G , Zhang Y *et al.* Functional implications of disulfide bond , C206-C210 , in recombinant prochymosin (chymosin) . *Biochemistry* , 2000 , **39** :12140 – 12148
- [20] Darby N J , Creighton T E . Dissecting the disulphide-coupled folding pathway of bovine pancreatic trypsin inhibitor , Forming the first disulphide bonds in analogues of the reduced protein . *J Mol Biol* , 1993 , **232** :873 – 896
- [21] Bulaj G , Kortenne T , Goldenberg D P . Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides . *Biochemistry* , 1998 , **37** :8965 – 8972
- [22] Fisher B , Sumner I , Goodenough P . Isolation , renaturation , and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies . *Biotechnol Bioeng* , 1993 , **41** :3 – 13
- [23] Thatcher D R , Wilks P , Chaudhuri J . Inclusion bodies and refolding in proteins Lab-fax (Hames B D and Rickwood D eds) . Academic Press , 1996 , pp. 119 – 130
- [24] De Bernardez Clark , E . Refolding of recombinant proteins . *Current Opinion Biotechnol* , 1998 , **9** :157 – 163
- [25] Boss M A , Kenten J H , Wood C R *et al.* Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesized in *E. coli* . *Nucl Acids Res* , 1984 , **12** :3791 – 3806
- [26] Rudolph R , Mattes R . Verfahren zur aktivierung von gentechnologisch hergestellten , heterologen . Disulfidebrücken aufweisende ukaryotischen proteinen nach expression in prokaryoten . 1986 EP 0219874
- [27] Cowley D J , Mackin R B . Expression , purification and characterization of recombinant proinsulin . *FEBS Lett* , 1997 , **402** :124 – 130
- [28] Winter J , Klappe P , Freedman R B *et al.* Catalytic activity and chaperone function of human protein disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin . *J Biol Chem* , 2002 , **277** :310 – 317
- [29] Cardamone M , Puri N K , Bradon M R . Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies . *Biochemistry* , 1995 , **34** :5773 – 5794
- [30] Lu B , Beck P J , Chang J . Oxidative folding of murin prion mPrP (23-231) . *Eur J Biochem* , 2001 , **268** :3767 – 3773
- [31] Hirose M , Akula T , Takahashi N . Renaturation of ovotransferrin under two-step conditions allowing primary folding of the fully reduced form and the subsequent regeneration of the intramolecular disulfides . *J Biol Chem* , 1989 , **264** :16867 – 16872
- [32] Buchner J , Pastan I , Brinkmann U . A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins : Single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies . *Anal Biochem* , 1992 , **205** :263 – 270
- [33] Buchner J , Rudolph R . Renaturation , purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli* . *Biol Technology* , 1991 , **9** :157 – 162
- [34] van den Berg B , Chung E W , Robinson C V *et al.* Characterization of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme . *J Mol Biol* , 1999 , **290** :781 – 796
- [35] Weissman J S , Kim P S . Efficient catalysis of disulfide bond rearrangement by protein disulfide isomerase . *Nature* , 1993 , **365** :185 – 188
- [36] Mayer M , Kies U , Kammermeier R *et al.* BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies *in vitro* . *J Biol Chem* , 2000 , **275** :29421 – 29425
- [37] Delom F , Mallet B , Carayon P *et al.* Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins . Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein . *J Biol Chem* , 2001 , **276** :21337 – 21342
- [38] Hober S , Forsberg G , Palm G *et al.* Disulfide exchange folding of insulin-like growth factor 1 . *Biochemistry* , 1992 , **31** :1749 – 1756
- [39] Miller J A , Narhi L O , Hua Q *et al.* Oxidative refolding of insulin-like growth factor 1 yields two products of similar thermodynamic stability . A bifurcating protein-folding pathway . *Biochemistry* , 1993 , **32** :5203 – 5213
- [40] Milner S J , Francis G L , Wallace J C *et al.* Mutation in the B-domain of insulin-like growth factor 1 influence the oxidative folding to yield products with modified biological properties . *J Mol Biol* , 1996 , **259** :293 – 313
- [41] Milner S J , Carver J A , Ballard F J *et al.* Probing the disulfide folding pathway of insulin-like growth factor 1 . *Biotechnol Bioeng* , 1999 , **62** :693 – 703
- [42] Weissman J S , Kim P S . The pro region of BPTI facilitates folding . *Cell* , 1992 , **71** :841 – 851
- [43] Rattenholl A , Ruoppolo M , Flagiello A *et al.* Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor . *J Mol Biol* , 2001 , **305** :523 – 533
- [44] Dobson C M , Ellis R J . Protein folding and misfolding inside and outside the cell . *EBMO J* , 1998 , **17** :5251 – 5154
- [45] Schultz C P . Illuminating folding intermediates . *Nat Struct Biol* , 2000 , **7** :7 – 10
- [46] Onuchic J N , Nemeyer H , Garcia A E *et al.* The energy landscape theory of protein folding : Insight into folding mechanism and scenarios . In *Advances in Protein Chemistry* . Vol 53 . Protein folding mechanism (Matthews C R ed) . Academic Press , 2000 pp. 88 – 152
- [47] Dill K A , Chan H S . From Levinthal to pathways to funnels . *Nat Struct Biol* , 1997 , **4** :10 – 19

Oxidative Refolding of Proteins

ZHANG Yu-Ying YANG Kai-Yu*

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract The mechanism of oxidative refolding of proteins was elucidated in more detail from the intensive and extensive studies in the past decades. 1. Most of the proteins examined so far proceed oxidative refolding via multiple pathways rather than a single and specific pathway. This is consistent with the folding energy landscape theory. 2. It is the native interactions rather than the non-native interactions that direct the folding process. This is not necessarily incompatible with the importance of the non-native disulfide intermediates in the bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) pathway , which are just a chemical necessity in the intramolecular arrangement to facilitate native disulfide formation. 3. Based on the BPTI refolding it was suggested that disulfide bonds have a stabilizing effect on the native state without determining either the folding pathway or the final three-dimensional structure of the protein. This point of view is not applicable to other proteins. Studies on the refolding of prochymosin unequivocally demonstrated that the formation of native disulfides is the prerequisite to the recovery of the native conformation. It is more likely that the interdependence between the native disulfide formation and the formation of native structure is a general rule. 4. At the early stage of oxidative refolding disulfide formation is essentially a random process , with the progress of refolding further disulfide formation is increasingly dependent on the conformations of the intermediates.

Enhancing the renaturation yield of recombinant proteins is a major challenge in biotechnology. In addition to aggregation , the formation of species with mispaired disulfide bonds is a leading cause of decreased yield. Progress in understanding the mechanism of oxidative refolding has provided insight into how to solve this problem. As described above , at the later stage of refolding disulfide formation depends on the conformations of intermediates. The intermediates with native-like and flexible structure favourable for native disulfide formation and correct refolding are productive intermediates , while the unproductive intermediates tend to adopt stable conformations , which render the thiol groups and disulfide bond(s) inaccessible and further folding unfavourable energetically. Therefore , the principle to enhance the renaturation yield of disulfide-containing proteins is to cause the productive intermediates to predominate by destabilizing the unproductive intermediates. To approach this , alkaline pH , low temperature , labilizing agents , protein disulfide isomerase and its analogues and alteration of primary structure have been proved useful to adjusting the structure of the unproductive intermediates so as to facilitate thiol/disulfide interchange and in turn the native disulfide formation.

The prospects for the oxidative refolding of proteins both in basic and applied researches are discussed in this review article.

Key words oxidative refolding , renaturation yield , disulfide bond , recombinant proteins