

DOI: 10.13376/j.cbls/2017014

文章编号: 1004-0374(2017)02-0114-08

· 评述与综述 ·

SMR蛋白: 一种跨膜蛋白演化研究的模式蛋白

赵永祥^{1,2}, 程儒进¹, 杨俊^{2*}, 谢浩^{1*}

(1 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 武汉 430070; 2 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子与分子物理国家重点实验室/武汉磁共振中心, 武汉 430071)

摘要: 多药抗性小蛋白 (small multidrug resistance protein, SMR) 是一类由 4 个跨膜螺旋束组成的跨膜质子梯度驱动的内膜转运蛋白, 一般由 100~140 个氨基酸残基组成, 结构相对简单, 在特定去垢剂中相对稳定并具有功能活性, 是研究细菌的耐药机制、跨膜转运蛋白的结构功能以及膜蛋白演化的一类很好的模式蛋白家族。同时, 由于其灵活多变的拓扑学分布以及在膜转运蛋白演化中节点的位置, 成为研究和追寻膜蛋白演化路径的理想模式蛋白。现分别从 SMR 蛋白家族的系统发生分布与进化、SMR 蛋白的耐药性与转运机制、SMR 蛋白的结构等 3 个方面对本领域的研究近况进行分析和总结。

关键词: SMR 蛋白家族; 系统发生树; 跨膜蛋白演化; 药物转运; 拓扑学结构

中图分类号: Q51; Q71 **文献标志码:** A

SMR protein: a model for studying evolution of transmembrane proteins

ZHAO Yong-Xiang^{1,2}, CHENG Ru-Jin¹, YANG Jun^{2*}, XIE Hao^{1*}

(1 School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2 State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Center for Magnetic Resonance, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: SMR proteins (small multidrug resistance proteins) are small transporters containing 100—140 amino acid residues. Transport of substrates by these proteins is driven by trans-membrane protons gradient. The structure of these proteins is relatively simple and contains four trans-membrane helices. Due to their simple structure, stability and functionality in detergents, these proteins are chosen as model proteins to study bacterial drug resistance, as well as structure, function and evolution of membrane proteins. In this article, the latest research progress is reviewed in relation to the distribution of SMR proteins, the drug resistance and transportation mechanism of SMR proteins, the structure of SMR proteins, and hypothesis of evolution pathways for membrane proteins.

Key words: SMR protein family; phylogenetic tree; transmembrane protein evolution; drug transport; topology

生命体系在生存过程中需要与外界环境进行物质能量交换和信号传递, 调控自身平衡, 维持正常的生命活动。细胞膜上的一些蛋白质主导或者协助完成这些生命过程, 其中有一类蛋白质与药物/代谢转运密切相关, 被称为药物/代谢转运蛋白超家族 (drug/metabolite transporter superfamily, DMT)。根据转运过程中利用能量的方式不同, DMT 蛋白可分为初级主动运输蛋白和次级运输蛋白。初级主动运输蛋白直接利用 ATP 水解提供的能量完成转运过程, 包括 ATP 偶联盒蛋白家族 (ATP-binding cassette

family, ABC); 次级运输蛋白利用跨膜质子或者离子梯度来驱动转运过程, 包括主易化蛋白家族 (major facilitator superfamily, MFS)、多重抗菌剂外排蛋白

收稿日期: 2016-06-25; 修回日期: 2016-07-31

基金项目: 武汉理工大学自主创新研究基金(2011-II-010, 2016IB006); 武汉理工大学教学研究项目(w2015003)

*通信作者: 杨俊, E-mail: yangjun@wipm.ac.cn; 谢浩, E-mail: h.xie@whut.edu.cn, Tel: 027-87884065, 手机: 18971099976

家族 (multiple antimicrobial extrusion family, MATE) 和多药抗性小蛋白家族 (the small multidrug resistance protein family, SMR)^[1]。

SMR 蛋白家族由一类分子量小、结构相对简单的多重药物转运蛋白组成, 是整个 DMT 蛋白超家族中最小的质子偶联跨膜转运蛋白。它能够利用跨膜质子梯度作为能量驱动将细胞内的大部分抗生素、防腐剂、抗肿瘤药物以及阳离子染料物质转运到细胞外, 使细菌表现出对多种药物分子的抗性^[2]。同时, 由于 SMR 蛋白拓扑学分布灵活多变, 可以形成平行和反平行的同源二聚体或者异源二聚体, 是一类研究跨膜转运蛋白的结构、功能、作用机制以及演化的理想模式蛋白家族。

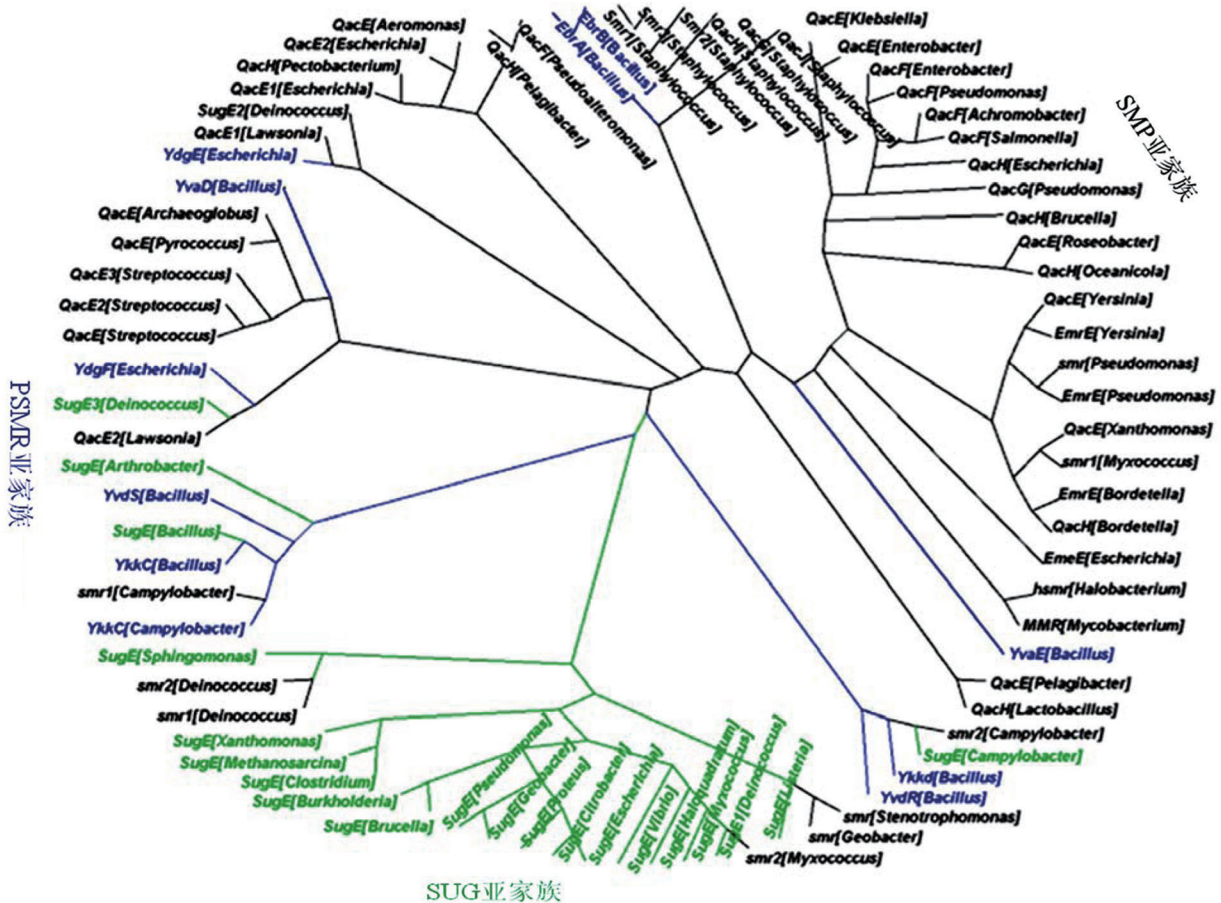
1 SMR蛋白家族的系统发生分布与进化

1.1 SMR蛋白家族的系统发生分布

SMR 蛋白基因在细菌基因组中分布广泛, 如

利用大肠杆菌 SMR 蛋白 EmrE 基因 (NCBI Refseq YP_002998353) 作为母源序列对 NCBI 数据库中的细菌基因组进行搜索, 发现 52% 的细菌基因组中都具有 SMR 蛋白同源序列^[3]。SMR 蛋白的物种来源包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、古生菌以及一些真核生物, 而且这些 SMR 蛋白的基因序列不仅存在于细菌染色体中, 在质粒、整合子中也有发现^[4]。根据系统发生分布及其他特性, 可将 SMR 蛋白家族分为 3 个蛋白亚家族, 即多药外排泵小蛋白亚家族 (small multidrug pumps, SMP)、groEL 突变抑制蛋白亚家族 (suppressor of groEL mutation proteins, SUG) 和成对存在的多药抗性小蛋白亚家族 (paired small multidrug resistance proteins, PSMR) (图 1)。

SMP 蛋白是 SMR 蛋白家族中分布最为广泛的一类蛋白, 它能够使宿主表现出对多种药物分子的抗性。目前已鉴定的 SMP 蛋白的靶标底物, 包括



以Eco-EmrE蛋白序列(NCBI Refseq YP_002998353.1)作为母源序列与 BLAST 获得的82条SMR蛋白序列进行多重序列比对(利用CLUSTALX进行比对), 并用PYTHON2.5软件将比对结果构建成系统进化树。其中黑色的表示SMP蛋白亚家族成员, 绿色的表示SUG蛋白亚家族成员, 蓝色表示的为PSMR蛋白亚家族成员。

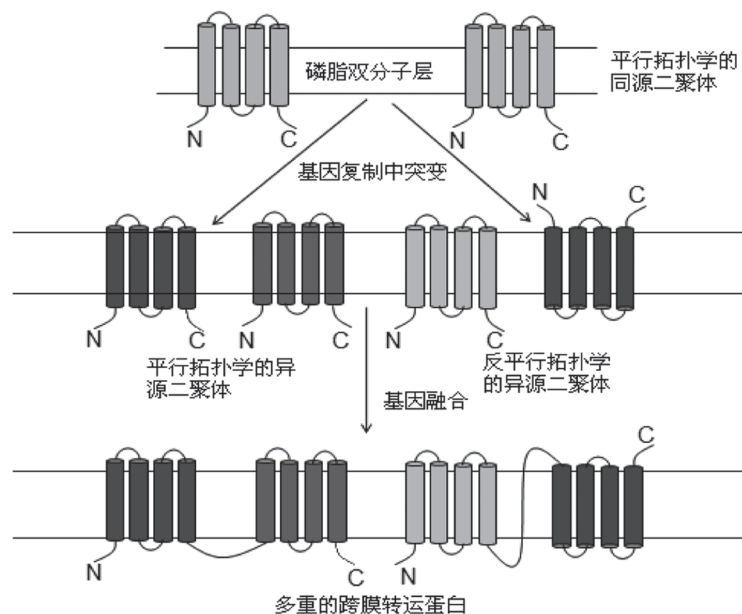
图1 细菌和古生菌中的82条SMR蛋白家族蛋白序列的系统进化树

季铵类化合物 (quaternary ammonium compounds, QACs) 如龙胆紫、磷酸三甲苯酯、苯甲烷铵、十六烷基三甲基溴化铵、氯化十六烷基吡啶等, 以及离子性染料物质, 如溴化二氨乙苯啡啶、结晶紫、派若宁 Y、番红精等^[5-7]。SUG 蛋白亚家族与 SMP 蛋白亚家族不同, 它们缺乏转运 QACs 和离子性染料物质的功能, 不过在过量积累的情况下, 某些 SUG 蛋白对少量的底物仍然有吸收和转运功能, 如大肠杆菌 SugE 在过量表达的情况下能够转运十六烷基三甲基溴化铵和氯化十六烷基吡啶^[8]。鉴于 SUG 蛋白这种潜在的吸收转运功能以及它们在 *groEL* 突变中所起的抑制作用, 有学者认为 SUG 蛋白可能转运一种目前未鉴定的与伴侣蛋白活性有关的底物, 但是对于 SUG 蛋白与 *groEL* 突变抑制的具体关系, 目前的研究仍然不是很透彻^[3]。PSMR 亚家族蛋白一般以成对的形式存在, 在这一对蛋白中其中一个蛋白的大小与常规的 SMP 蛋白大小相当, 另一个蛋白比常规的 SMP 蛋白要大。只有当 PSMR 蛋白对应的 2 个基因同时表达时, 才具有转运活性和多药抗性。

1.2 SMR 蛋白家族与膜转运蛋白进化

大多数跨膜蛋白在细胞膜上都有一个确定的拓扑学定位, 即单拓扑学结构。少量的膜蛋白在细胞膜上的定位是二重的, 甚至是多重的, 这与蛋白质

合成后插入细胞膜的方式有关, 如氟离子通道蛋白在细胞膜就采用双拓扑学形式分布^[9]。SMR 蛋白的拓扑学分布比较特殊, 对于每个 SMR 蛋白单体, 它是以平行对称的形式存在, 而 SMR 蛋白的功能二聚体却以一种不对称的反平行结构来行使转运功能。SMR 蛋白这种灵活多变的拓扑学分布以及其在特定去垢剂中相对稳定的功能活性, 使它成为膜转运蛋白演化研究中的一个理想模式对象。膜转运蛋白的演化是从简单的蛋白单体开始, SMR 蛋白作为最小的离子耦联的膜转运蛋白, 结构相对简单, 拓扑学分布灵活, 被认为是膜转运蛋白演化的起始点, 在演化过程中通过基因的复制、突变、融合等作用, 结合环境的选择性压力, 从而形成各种各样的跨膜转运蛋白, 来完善细胞的跨膜物质转运, 适应环境。例如在跨膜蛋白演化过程中, 常常会形成反向对称结构, 这种反向对称结构与物质转运时蛋白构象的变化迁移密切相关, 而在 SMR 蛋白家族中 PSMR 亚家族蛋白通常由 2 个亲缘相近的异源蛋白组成, 而 SMP 和 SUG 亚家族通过形成同源二聚体的形式来完成转运过程, 这与反向对称结构的说法契合。一种基于 SMR 蛋白家族的膜转运蛋白简单演化路径 (图 2): 首先, 膜转运蛋白单体基因在复制过程发生突变, 产生平行拓扑学分布的异源二聚体或者是反平行拓扑学分布的异源二聚体; 然后,



以 SMR 蛋白作为起点对跨膜蛋白的演化路径进行追溯的一种假说, 在这个假说中结构简单, 拓扑学灵活多变的 SMR 蛋白作为起点通过基因突变形成多重拓扑学结构分布, 然后通过基因融合组装成更加复杂的跨膜蛋白。

图2 一种可能的跨膜蛋白进化路径示意图

这些异源二聚体的基因发生融合, 形成结构更复杂的膜转运蛋白, 满足相应的转运要求。通过基因复制时的突变形成不同的异源二聚体, 可以极大地满足细胞对底物的转运要求, 扩大转运物质的范围, 提供细胞对环境的适应性^[10-11]。

2 SMR蛋白家族的药物与抗性转运机制

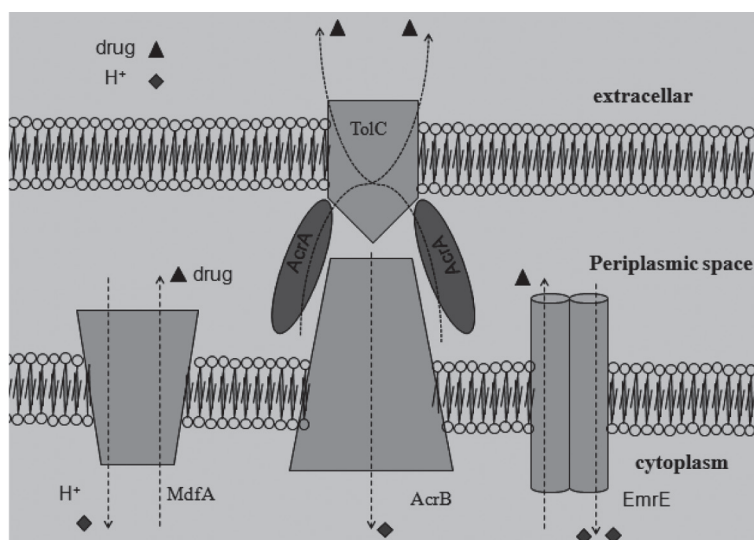
2.1 SMR蛋白的药物抗性

SMR蛋白能够使宿主细胞表现出对一系列季铵化合物、带正电荷的芳香类染料物质以及抗生素、防腐剂、抗肿瘤药物等分子的广谱抗性。SMR蛋白药物抗性不仅仅取决于自身的表达水平, 还受多重耐药外排转运系统 Δ AcrA/B-TolC的影响。例如在大肠杆菌SMR蛋白EmrE的抗药性研究中发现, EmrE外源表达载体在 Δ acrA、 Δ acrB、 Δ tolC等缺陷菌株中所贡献的药物抗性大大低于非缺陷性菌株表达所贡献的药物抗性。Nasie等^[12]通过突变实验发现AcrAB复合物与一些药物/代谢转运蛋白, 包括SMR蛋白相互作用, 构成一个多药外排系统的复合结构, 共同完成各种药物分子的外排转运。在这个系统中, 药物/代谢转运蛋白(包括EmrE、MdfA等蛋白)负责将底物分子从细胞质中转运到周质空间, 然后, AcrAB-TolC复合物再将周质空间中的底物分子转运到细胞外, 完成底物外排转运过程, 通过这种重复协作的转运方式, 极大地扩展细胞对有害物质的转运范围和力度, 从而增强它们

对环境的适应能力, 如图3所示。

2.2 SMR蛋白的分子转运机制

在SMR蛋白将底物分子转运到细胞周质的过程中, SMR蛋白以二聚体的形式来行使功能, 其中SMP和SUG蛋白以同源二聚体的形式参与底物转运, 而PSMR蛋白以异源二聚体的形式参与转运。转运过程中SMR蛋白第一个跨膜螺旋中带负电的Glu残基作为质子耦合中心, 在不同的pH值环境中调控质子或者底物分子与Glu的羧基进行竞争性结合, 通过结合后功能转运单位的构象变化实现底物分子和质子的反向跨膜转运^[13-14]。以大肠杆菌中SMR蛋白EmrE为例, 在转运过程中, EmrE蛋白的第一个跨膜螺旋中的Glu¹⁴的羧基作为质子耦合中心^[15-16], Glu¹⁴附近的一些芳香类氨基酸残基, 如Trp⁶³、Tyr⁴⁰和Tyr⁶⁰等, 在Glu¹⁴附近构成一个疏水环境调控Glu¹⁴的pKa值^[17-18], 介导Glu¹⁴羧基的质子在不同离子梯度环境中的释放和结合, 从而介导底物分子的结合和释放, 同时这些疏水性的芳香类氨基酸构成的疏水结构也与底物结合相关^[19-20]。在Eco-EmrE的外排转运过程中: 首先, 带正电的底物分子靠近转运蛋白, 通过与Glu¹⁴附近芳香性的带负电的氨基酸的静电作用诱发EmrE的Glu¹⁴残基丢失质子; 然后, 底物分子与EmrE二聚体形成的疏水结合域结合。与此同时, EmrE的构象发生改变, 使得疏水性结合域由朝向细胞质变为朝向细胞周质方向打开。由于质子浓度的改变,



在大肠杆菌AcrAB-TolC、EmrE和MdfA多重药物345678外排系统中, EmrE蛋白和MdfA蛋白将药物分子转运到周质空间中, 然后通过AcrAB-TolC系统将药物分子转运到细胞外。

图3 AcrAB-TolC、EmrE和MdfA蛋白协同作用转运模式图

细胞周质中的2个质子进入疏水性结合口袋，催化底物释放。重新质子化的二聚体又恢复到原来的构象，进行下一轮转运^[21-22](图4)。

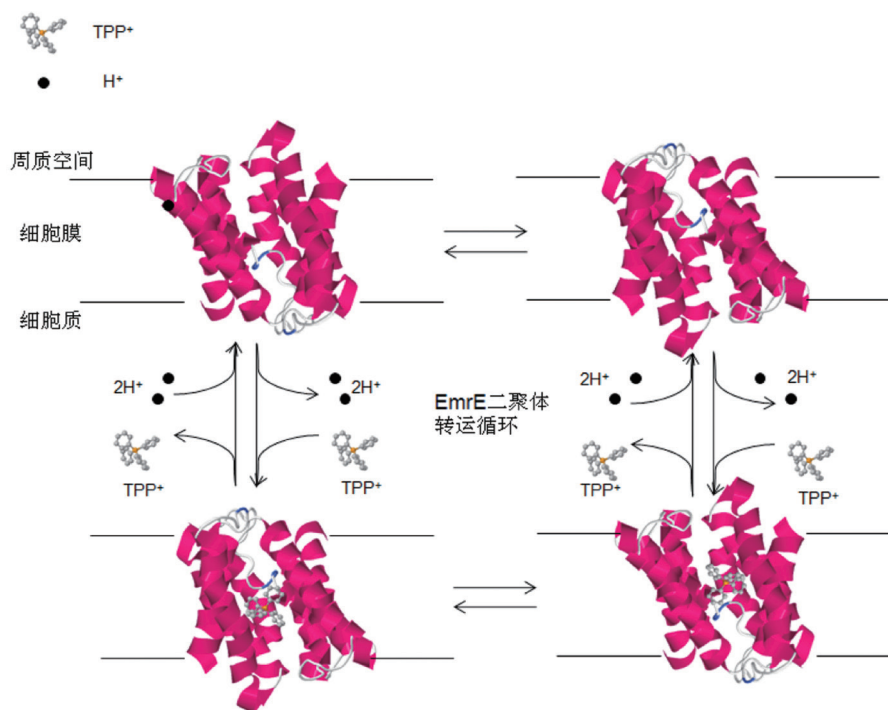
3 SMR蛋白的结构和拓扑学分布

SMR蛋白含有100~140个氨基酸残基，由4个跨膜 α 螺旋束组成。4个跨膜螺旋束不能形成一个有效的质子耦合的跨膜转运复合物，它们一般以多聚体的形式行使转运功能。SMP和SUG亚家族蛋白以同源二聚体形式来完成其功能，而PSMR共表达两个基因才具有转运功能，其功能形式为异源二聚体^[23-24]。SMR蛋白结构的研究对于了解SMR蛋白与药物分子的相互作用、蛋白拓扑学结构以及二级转运蛋白精细转运机制具有重要意义。目前高分辨率的SMR蛋白的结构信息相对缺乏，研究最广泛的是大肠杆菌SMR蛋白Eco-EmrE。

对大肠杆菌SMR蛋白EmrE的二聚体的拓扑学分布和结构的研究，一直在争议中前行^[25]。大量的生化实验结果表明，Eco-EmrE蛋白单体存在一个 $N_{in}-C_{in}$ 的平行拓扑学结构，并且2个EmrE单体在结构上是对称的，如通过电喷雾电离质谱技术证明了EmrE二聚体上的2个关键的 Glu^{14} 具有相同

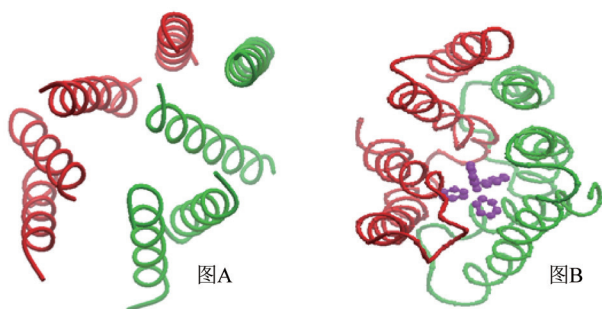
的疏水环境，并且在功能上是等价的^[15]，通过功能性实验证明拥有这种平行性拓扑学的EmrE蛋白在完整的活体细胞上和重建的质膜上都拥有底物结合和转运活性^[26-28]；但是Eco-EmrE的结构研究所获得的信息与生化实验获得的信息相冲突，这些结构数据表明，Eco-EmrE二聚体以一个不对称的反平行结构形式存在，如利用NMR对 Glu^{14} 的 ^{13}C 的化学位移进行测量时，发现两个底物结合域是不对称的^[29]，对EmrE蛋白的二维结晶的cryo-EM解析获得分辨率为7.5埃的三维结构，表明EmrE的最小的功能单位是由8个跨膜螺旋束组成的不对称的同源复合物^[30](图5A)。用X射线晶体衍射获得的高分辨率的结合和不结合TPP的EmrE的三维结构同样表明，EmrE拥有一个不对称的反平行拓扑学结构^[31]，但是这个结构由于数据分析处理失误导致结构计算错误后来通过重新修正发表^[32](图5B)。然而，Schudiner等^[33]认为EmrE的这种反平行拓扑学分布可能是由结晶时的环境形成的非自然状态的结构。

EmrE蛋白同源二聚体的这种反平行分布的拓扑学结构难以进行预测，一般认为膜蛋白插入膜时遵循“正电荷朝内”的原则，但是对于EmrE和以及其他的SMP和SUG亚家族的蛋白来说，它们没



在EmrE蛋白单点交互式转运循环模型中， Glu^{14} 通过感知膜两侧的质子浓度差别，选择性地和带正电的底物分子或者质子结合，通过结合后的构象变化使得蛋白朝另一侧打开，介导底物或者质子的释放，从而实现 Glu^{14} 与底物分子、质子的交互式结合释放循环过程。

图4 EmrE蛋白单点交互式转运循环模型



图A为用cryo-EM手段获得的分辨率为7.5 Å的EmrE的三维结构(PDB ID 2i68); 图B为X射线晶体衍射手段获得的分辨率为4.4 Å的EmrE的三维结构(PDB ID 3B62)。其中红色为EmrE的一个单体, 绿色为另一个单体, 紫色为药物分子TPP⁺。

图5 两种不同解析方式获得的EmrE三维结构图

有明显的电荷偏好, 两侧的电荷分布几乎一样。最近研究表明, EmrE 单体插入膜上是随机的, 既有朝内的拓扑学分布, 也有朝外的拓扑学分布, 两个按照 1 : 1 的比例插入膜上形成一个反平行分布的同源二聚体复合物, 至于两者的入膜方式和比例控制目前仍然不是很清楚, 缺乏相关的信息^[34]。实际上, 对于 EmrE 蛋白来说, 一个小的电荷分布改变都可以引起 EmrE 单体的拓扑学分布变化^[35]。这些研究在一定程度上表明 EmrE 二聚体的反平行拓扑学分布的存在是可能的, 并没有明确地验证 EmrE 二聚体的拓扑学分布。对结合 TPP⁺ 的 EmrE 的大量 SPR 研究证实, EmrE 二聚体拥有和 cryo-EM 及 X-射线衍射获得的一致反平行拓扑学分布^[36]。对 EmrE 蛋白二聚体拓扑学分布最确切手段是测定二聚体中每个单体的拓扑学分布, 在最近的研究中对结合 TPP⁺ 的 EmrE 单体单一定点标记, 进行单分子 FRET 的测定, 发现对于每一个标记位点在膜的两侧都可以观察到单一的 FRET 效应, 证实了 EmrE 二聚体用于反平行的拓扑学分布^[37]。在对不结合底物的 EmrE 的拓扑学结构的研究中, cryo-EM 及 X-射线衍射和 SPR 等手段获得的实验结果表明, 与结合了 TPP⁺ 的 EmrE 二聚体相比, 除了在跨膜螺旋的倾斜度等方面有一定区别外, 两者几乎一样^[38]。实际上, 2010 年, Seppala 等^[36] 最新研究成果表明, 反平行拓扑学分布的 EmrE 二聚体的不对称结构可能通过朝内和朝外构象的转变达到“动态对称”行使转运功能, 在转运过程中朝内和朝外构象除了拓扑学定位不一样以外, 其他方面都是一样的, 即不对称的 EmrE 二聚体结构拥有一个

动态对称的功能效应。这很好地解释了以往研究中所出现的生化实验和生物物理实验结论相冲突的问题。

4 小结

在 SMR 蛋白的研究过程中, 不同的研究小组在独立的实验环境中对 SMR 蛋白做了大量研究工作, 鉴于 SMR 蛋白拓扑学灵活多变, 对环境敏感的特性, 带来很多矛盾和争议, 可喜的是目前的研究成果使人们对 SMR 蛋白逐步建立起一个统一看法: 反平行拓扑学分布的 EmrE 二聚体的不对称结构通过朝内和朝外构象的转变达到“动态对称”行使转运功能, 即不对称的 EmrE 二聚体结构拥有一个动态对称的功能效应。目前关于 SMR 蛋白的研究, 一方面是要获得分辨率高的精确三维结构, 解决在以前研究中结构信息与生化信息相冲突的问题, 同时对于了解跨膜蛋白精细的转运机制及转运所需的最小通道结构具有重要意义, 在 SMR 蛋白的结构解析中, 电镜冷冻蚀刻技术 (cryo-EM) 获得的结构分辨率不够, X 射线衍射技术获得的结构虽然分辨率足够, 但是在结晶过程中获得真实结构的 SMR 蛋白晶体相对困难。多维魔角旋转固体磁共振 (MAS-Solid-NMR) 被认为是解决膜蛋白三维结构的一个很好的手段, 在构建的蛋白脂质体中跨膜蛋白所处的磷脂环境与目标蛋白的自然细胞膜环境最接近^[39-40]。另一方面要确定 SMR 蛋白的拓扑学分布, 这对于准确了解 SMR 蛋白与底物的结合情况与转运机制十分有益, 同时对于了解整个膜蛋白的演化路径具有重要参考价值。

[参 考 文 献]

- [1] Jack DL, Yang NM, Saier MH. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3620-39
- [2] Schuldiner S. EmrE, a model for studying evolution and mechanism of ion-coupled transporters. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794: 748-62
- [3] Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 1814-38
- [4] Bay DC, Turner RJ. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evol Biol*, 2009, 9: 140
- [5] Chung YJ, Saier MH. SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr Opin Drug Discov*, 2001, 4: 237-45
- [6] Bjorland J, Steinum T, Sunde M, et al. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary

- ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 3046-52
- [7] Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5803-12
- [8] Chung YJ, Saier MH Jr. Overexpression of the *Escherichia coli sugE* gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J Bacteriol*, 2002, 184: 2543-5
- [9] Randy BS, Kolmakova-Partensky L. Crystal structures of a double-barrelled fluoride ion channel. *Nature*, 2015, 525: 548-51
- [10] Woodall NB, Yin Y, Bowie JU, et al. Dual-topology insertion of a dual-topology membrane protein. *Nat Commun*, 2015, 6: 8099
- [11] Poolman B, Geertsma ER, Slotboom DJ, et al. A missing link in membrane protein evolution. *Science*, 2007, 315: 1229-31
- [12] Nasie I, Steiner-Mordoch S, Gold A, et al. Topologically random insertion of EmrE supports a pathway for evolution of inverted repeats in ion-coupled transporters. *J Biol Chem*, 2010, 285: 15234-44
- [13] Tal N, Schuldiner S. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9051-6
- [14] Dastvan R, Fischer AW, Mishra S, et al. Protonation-dependent conformational dynamics of the multidrug transporter EmrE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 1220-52
- [15] Gayen A, Leninger M, Traaseth NJ, et al. Protonation of a glutamate residue modulates the dynamics of the drug transporter EmrE. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 141-5
- [16] Bay DC, Turner RJ. Spectroscopic analysis of the intrinsic chromophores within small multidrug resistance protein SugE. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808: 2233-44
- [17] Sikora CW, Turner RJ. Investigation of ligand binding to the multidrug resistance protein EmrE by isothermal titration calorimetry. *J Biophys*, 2005, 88: 475-48
- [18] Yerushalmi H, Schuldiner S. An essential glutamyl residue in EmrE, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 5264-9
- [19] Weinglass AB, Soskine M, Vazqu JL, et al. Exploring the role of a unique carboxyl residue in EmrE by mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2005, 280: 7487-92
- [20] Elbaz Y, Tayer N, Steinfels E, et al. Substrate induced tryptophan fluorescence changes in EmrE, the smallest ion-coupled multidrug transporter. *Biochemistry*, 2005, 44: 7369-77
- [21] Rotem D, Steiner-Mordoch S, Schuldiner S, et al. Identification of tyrosine residues critical for the function of an ion-coupled multidrug transporter. *J Biol Chem*, 2006, 281: 18715-22
- [22] Padariya M, Kalathiya U, Baginski M, et al. Structural and dynamic changes adopted by EmrE, multidrug transporter protein—Studies by molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848: 2065-74
- [23] Adam Y, Tayer N, Rotem D, et al. The fast release of sticky protons: Kinetics of substrate binding and proton release in a multidrug transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17989-94
- [24] Jack DL, Storms M, Tchieu JH, et al. A broad-specificity multidrug efflux pumps requiring a pair of homologous SMR-type proteins. *J Bacteriol*, 2000, 182: 2311-3
- [25] Butler PJ, Ware UB, Tate CG, et al. The *Escherichia coli* multidrug transporter EmrE is a dimer in the detergent-solubilised state. *J Mol Biol*, 2004, 340: 797-808
- [26] Schuldiner S. Controversy over EmrE structure. *Science*, 2007, 317: 748
- [27] Rapp M, Seppala S, Granseth E, et al. Emulating membrane protein evolution by rational design. *Science*, 2007, 315: 282
- [28] Rapp M, Seppala S, Granseth E, et al. Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13:112-6
- [29] Steiner-Mordoch S, Soskine M, Solomon D, et al. Parallel topology of genetically fused EmrE homodimers. *EMBO J*, 2008, 27: 17-26
- [30] Manolikas T, Kaiser C, Karas M, et al. The key residue for substrate transport (Glu14) in the EmrE dimer is asymmetric. *J Biol Chem*, 2008, 283: 3281-8
- [31] Ubarretxena-Belandia I, Baldwin JM, Schuldiner S, et al. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J*, 2003, 22 : 6175-81
- [32] Chen, YJ, Pornillos O, Lieu S, et al. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 18999-9004
- [33] Korkhov VM, Tate CG. An emerging consensus for the structure of EmrE. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr*, 2009, 65: 186-92
- [34] Schuldiner S. When biochemistry meets structural biology: the cautionary tale of EmrE. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32: 252-8
- [35] Nasie I, Steiner-Mordoch S, Gold A, et al. Topologically random insertion of EmrE supports a pathway for evolution of inverted repeats in ion-coupled transporters. *J Biol Chem*, 2010, 285: 15234-44
- [36] Seppala S, Slusky JS, Lloris-garcera P, et al. Control of membrane protein topology by a single C-terminal residue. *Science*, 2010, 328: 1698-700
- [37] Amadi ST, Koteiche HA, Mishra S, et al. Structure, dynamics, and substrate-induced conformational changes of the multidrug transporter EmrE in liposomes. *J Biol Chem*, 2010, 285: 26710-8
- [38] Morrison EA, DeKoster GT, Dutta S, et al. Antiparallel EmrE exports drugs by exchanging between asymmetric structures. *Nature*, 2012, 481: 45-50
- [39] Henzler-Wildman K. Analyzing conformational changes in the transport cycle of EmrE. *Struct Biol*, 2012, 22: 38-43
- [40] Agarwal V, Fink U, Schuldiner S, et al. MAS solid-state NMR studies on the multidrug transporter EmrE. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768: 3036-43

- [41] Poget SF, Harris R, Cahill SM, et al. ^1H , ^{13}C , ^{15}N backbone NMR assignments of the *Staphylococcus aureus* small multidrug-resistance pump (Smr) in a functionally active conformation. *Biomol NMR Assign*, 2010, 4: 139-42