

DOI: 10.13376/j.cbls/2023038

文章编号: 1004-0374(2023)03-0307-08



王初, 北京大学化学与分子工程学院教授, 北大-清华生命科学联合中心研究员, 北京大学前沿交叉学科研究院副院长。先后获得国家青年千人计划、国家杰出青年科学基金等项目的支持; 获得“国际化学生物学学会青年化学生物学家奖”、“药明康德生命化学研究学者奖”等。其课题组主要研究领域为化学和计算驱动的功能蛋白质组学, 主要研究方向包括: (1) 运用化学蛋白质组学和化学生物学技术发掘细胞内发生翻译后修饰的氨基酸功能位点; (2) 利用组学技术分析和鉴定生物活性分子在细胞内的分子靶标及作用位点; (3) 研发计算生物学方法, 对蛋白质组中的功能位点进行精准的预测。



秦为, 清华大学药学院助理教授, 特别研究员, 清华-北大生命科学联合中心研究员。秦为博士于2019年获得北京大学博士学位, 师从王初教授和陈兴教授。随后在斯坦福大学进行博士后研究, 合作导师为化学生物学家 Alice Y. Ting 教授。秦为课题组将针对蛋白质动态网络和翻译后修饰等重要生物学问题, 围绕以下三个主要研究方向, 发展时空分辨的化学生物学工具和功能蛋白质组学技术: (1) 发展时空分辨的蛋白质组学方法, 解析活细胞中蛋白质的空间转运和构象变化等动态信息; (2) 发展多维度蛋白质组学技术, 探索蛋白质-核酸、蛋白质-蛋白质以及蛋白质-小分子相互作用; (3) 挖掘宿主-病原体相互作用界面中的功能性翻译后修饰。

衣康酸修饰的化学蛋白质组学分析

秦 为^{1*}, 王 初^{2*}

(1 清华大学药学院, 清华-北大生命科学联合中心, 北京 100084;

2 北京大学化学与分子工程学院, 北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871)

摘 要: 衣康酸是近年来被发现的参与到病原体-宿主相互作用中的炎症调控代谢物。衣康酸由于其亲电性可以共价修饰蛋白质中的半胱氨酸, 从而调控底物蛋白的功能并介导其在巨噬细胞中的抗炎活性。目前, 科学家们利用化学蛋白质组学技术大规模地鉴定了巨噬细胞与病原菌中的衣康酸修饰蛋白及位点, 揭示了衣康酸修饰在糖酵解、细胞死亡和炎性小体活化等过程中的重要调控作用。现就衣康酸修饰生物学功能及其化学蛋白质组学分析方法的研究进展进行综述, 并对该领域的研究难点进行探讨和展望。

关键词: 衣康酸; 化学蛋白质组学; 翻译后修饰; 固有免疫; 化学探针

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A

收稿日期: 2022-11-04; 修回日期: 2023-01-11

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFA1304700); 国家自然科学基金项目(21925701, 92153301)

*通信作者: E-mail: weiqin@mail.tsinghua.edu.cn (秦为); chuwang@pku.edu.cn (王初)

Chemoproteomic profiling of cysteine itaconation

QIN Wei^{1*}, WANG Chu^{2*}

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2 College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Itaconate has been recently recognized as an immune-modulatory metabolite involved in the host-pathogen interface. Itaconate, as an α,β -unsaturated dicarboxylic acid, could covalently modify cysteine and modulate protein function, contributing to its anti-inflammatory effect in macrophages. Chemoproteomics enables the large-scale identification of itaconated proteins and sites in macrophages and pathogens, revealing the important regulatory roles of itaconate in biological processes including glycolysis, cell death and inflammasome activation. This review summarizes the recent progresses on itaconation in terms of its biological functions and chemoproteomic profiling methods, and highlights the research challenges in this field.

Key words: itaconate; chemoproteomics; post-translational modifications; innate immunity; chemical probes

固有免疫在宿主抵抗外源病原菌入侵中起关键作用, 是人体免疫系统中的第一道屏障, 而巨噬细胞在固有免疫中扮演着非常重要的角色^[1]。一方面, 巨噬细胞可以识别并吞噬病原菌, 形成吞噬小体后与溶酶体融合产生吞噬溶酶体, 而吞噬溶酶体可以将病原菌裂解从而实现抗菌作用^[2]。另一方面, 感应到病原菌入侵的巨噬细胞会快速表达并分泌一系列的炎症因子, 这些炎症因子可以调控免疫系统中其他细胞的功能, 共同介导宿主对外源病原菌的抵抗。

近年来, 巨噬细胞在炎症状态下的代谢重编程被认为在免疫响应过程中起重要作用^[3]。炎症刺激下的巨噬细胞具有较高的葡萄糖摄取能力和糖酵解水平, 而三羧酸循环水平会受到抑制^[4-5]。一些三羧酸循环中间体, 如琥珀酸^[6]、富马酸^[7]、 α -酮戊二酸^[8]和衣康酸^[9], 最近被报道广泛参与调控免疫过程。

衣康酸的发现可以追溯到18世纪, Samuel Baup 在研究细菌中柠檬酸降解时发现了衣康酸, 并且认为衣康酸是线粒体代谢系统中的中间体, 但它在哺乳动物细胞中是否存在一直不清楚。直到2011年, 研究人员先后在感染了结核分枝杆菌的小鼠肺部和脂多糖(LPS)刺激的巨噬细胞中发现了衣康酸的大量产生^[10-11]。值得注意的是, 衣康酸的浓度在LPS刺激下迅速增加至毫摩水平。通过¹³C葡萄糖标记追踪技术, Strelko等^[11]进一步发现衣康酸是从顺式乌头酸衍生物而来, 而顺式乌头酸是在三羧酸循环中由柠檬酸产生。2013年, Michelucci等^[12]发现LPS诱导表达的衣康酸合成酶IRG1催化了衣

康酸的产生。在巨噬细胞的静息状态下, IRG1基本上不表达, 而在被激活的巨噬细胞中其表达水平升高了近200倍。除了在免疫细胞中存在IRG1的表达, 一些非免疫细胞中也发现了IRG1的表达, 包括寨卡病毒感染后的神经元^[13]。

衣康酸可以在IRG1的快速表达下迅速增加, 而巨噬细胞中也存在可以降解衣康酸的通路, 因此衣康酸是一个高度动态可调控的代谢物。衣康酸可以被代谢生成衣康酰辅酶A和柠草酰辅酶A, 而哺乳细胞中负责这两步代谢的酶目前尚未被鉴定。柠草酰辅酶A可以被柠草酰辅酶A裂解酶(CLYBL)降解为乙酰辅酶A和丙酮酸, 该裂解酶缺失会导致衣康酸的累积^[14]。除此之外, 在病原菌入侵巨噬细胞的过程中, 大量的衣康酸还会被分泌到胞外以及吞噬小体中, 从而实现抗菌作用^[15]。与此相对应, 病原菌也发展了一套类似的降解衣康酸的系统。在该系统中, 衣康酸会被衣康酰辅酶A转移酶代谢为衣康酰辅酶A, 进一步被衣康酰辅酶A水合酶代谢为柠草酰辅酶A, 最后被柠草酰辅酶A裂解酶降解为丙酮酸和乙酰辅酶A。目前在多种病原菌中都发现了这三个酶的基因, 表明这是一个普适性的病原菌抵抗宿主防御的系统。

为了研究衣康酸在病原菌宿主相互作用界面中的调控功能, Lampropoulou等^[16]建立了IRG1敲除的小鼠模型, 发现在脂多糖刺激的情况下IRG1敲除小鼠的巨噬细胞会分泌更多的炎症因子, 表明衣康酸在炎症巨噬细胞中起到了抗炎作用; 同时, 由于衣康酸和琥珀酸在结构上类似, 作者发现衣康酸可以竞争性地抑制琥珀酸脱氢酶的活性, 导致琥

珀酸的累积而抑制炎症因子的表达。

衣康酸具有一个亲电的 α,β - 不饱和羧酸结构, 理论上它可以通过迈克尔加成反应与蛋白质的半胱氨酸残基反应, 从而在不需酶的辅助下产生蛋白质衣康酸修饰。衣康酸对半胱氨酸的反应活性与富马酸类似, 而化学蛋白质组学技术揭示富马酸修饰的蛋白质多达上百种^[17-18], 这暗示着衣康酸有可能也具有较多的共价修饰蛋白, 从而通过调控修饰蛋白的功能介导衣康酸的抗炎作用。本文旨在对近年来被发现的衣康酸修饰蛋白及其功能调控机制进行总结(表 1), 同时介绍并讨论针对衣康酸修饰蛋白的化学蛋白质组学分析方法。

1 衣康酸修饰蛋白

第一个被发现的衣康酸共价修饰蛋白是 KEAP1^[28], 它是抗氧化响应过程中非常重要的一个调控蛋白。KEAP1 通常与转录因子 NRF2 结合并促进 NRF2 的降解, 敲除 KEAP1 可以稳定 NRF2 并促进其迁移到细胞核中, 从而激活 NRF2 的抗氧化和抗炎信号通路。富马酸二甲酯可以共价修饰 KEAP1 的多个半胱氨酸, 抑制 KEAP1 和 NRF2 的相互作用, 从而促进 NRF2 进入细胞核^[19]。2018 年, Mills 等^[28] 发现衣康酸也可以共价修饰 KEAP1 的多个半胱氨酸, 以与富马酸二甲酯类似的方式激活 NRF2 的转录。敲除 NRF2 可以显著抑制衣康酸所产生的抗炎作用, 表明衣康酸的抗炎作用在很大程度上是通过激活 NRF2 所介导的。与此同时, 作者利用无富集的非靶向蛋白质组学还鉴定到另外 7 个内源的衣康酸修饰位点, 包括糖酵解通路中的乳酸脱氢酶 A (LDHA)。

除了修饰蛋白上的半胱氨酸, 细胞中大量的谷胱甘肽 (GSH) 上的巯基也可以与衣康酸反应, 从而

造成细胞内的亲电压力环境^[20]。亲电压力环境除了会激活 NRF2 通路外, 还可以激活热压力响应和自噬 - 溶酶体等压力响应通路。这些通路往往受到一些调节因子的调控, 其中衣康酸造成的亲电压力可以有效地激活转录因子 ATF3 的表达和压力响应相关蛋白的转录活性。同时, 衣康酸也可以显著抑制 NF- κ B 的活性, 从而抑制相关炎症因子的产生。

除了以上两个衣康酸修饰底物, 近年来还有多个衣康酸修饰蛋白被陆续报道, 包括负责溶酶体生成的关键转录因子 TFEB。李新建课题组发现 TFEB 第 212 位半胱氨酸在细菌侵染过程中会发生衣康酸修饰, 从而拮抗第 211 位丝氨酸上的磷酸化修饰, 促进 TFEB 进入细胞核并通过其转录活性促进溶酶体生成^[27]。有趣的是, 另一项研究几乎同时报道 TFEB 的转录激活可以促进 IRG1 的表达和衣康酸的产生, 从而抑制巨噬细胞中细菌的生长^[27]。

2 利用竞争性 ABPP 策略鉴定衣康酸修饰位点

虽然衣康酸在 KEAP1 和 GSH 等底物上的无酶催化修饰一定程度上揭示了衣康酸抗炎作用的机制, 大规模鉴定衣康酸修饰的其他底物蛋白有助于更加全面地理解衣康酸在免疫响应中所发挥的作用^[29-30]。然而, 衣康酸较低的巯基反应活性理论上会导致衣康酸在蛋白上的修饰水平较低, 因此大量未修饰的肽段会严重地干扰衣康酸修饰肽段的鉴定。这一问题在数据依赖型的蛋白质组学采集模式下尤其严重。因此, 发展特异性富集衣康酸修饰蛋白的方法变得至关重要。但目前还没有衣康酸修饰的抗体被开发, 这在很大程度上阻碍了衣康酸修饰蛋白的鉴定以及相关功能的探索。

化学蛋白质组学技术通过将化学探针和蛋白质组学方法有机结合, 从而对蛋白质的功能进行大规模

表1 已验证的衣康酸修饰蛋白及其功能调控机制

衣康酸修饰底物	修饰位点	功能调控	文献
KEAP1	Cys151、Cys257、Cys288、Cys273	激活NRF2转录	[19]
GSH	N/A	引发胞内亲电压力	[20]
ALDOA	Cys73、Cys339	抑制酶活和糖酵解	[21]
GAPDH	Cys22	4-OI抑制酶活和糖酵解	[22]
SDHA	Cys84	抑制酶活	[19,21]
RIPK3	Cys360	促进RIPK3磷酸化	[23]
NLRP3	Cys548	抑制炎症小体活化	[23-24]
GSDMD	Cys77	介导炎症小体晚期耐受	[23,25]
JAK1	Cys715、Cys816、Cys943、Cys1130	抑制酶活和M2型极化	[26]
TFEB	Cys212	促进转录活性和溶酶体生成	[27]

模的注释,并对生物活性小分子的蛋白靶标进行深入挖掘。其中最常用的化学蛋白质组学技术是由 Scripps 研究所的 Benjamin Cravatt 教授开发的基于活性的蛋白质分析技术(activity-based protein profiling, ABPP)^[31]。利用靶向半胱氨酸的碘乙酰胺化学探针, Cravatt 课题组发展了基于同位素的串联正交蛋白水解-ABPP 技术(isoTOP-ABPP),实现了对蛋白质组中半胱氨酸活性的大规模分析^[32]。更重要的是,基于活性小分子对化学探针在特定半胱氨酸上的竞争作用,该技术被进一步拓展至分析活性小分子在半胱氨酸上的共价修饰^[33]。该竞争性 isoTOP-ABPP 技术已被广泛应用于鉴定半胱氨酸上的各类翻译后修饰,包括脂源性亲电小分子修饰^[33]、富马酸修饰^[17]以及共价药物^[34]在蛋白质组中的半胱氨酸修饰等。

利用乙酰化非天然糖探针在糖代谢标记过程中和半胱氨酸的副反应^[35], Qin 等^[21]发展了一种新型半胱氨酸探针 1-OH-Az,建立了一种高效的半胱氨酸化学蛋白质组学分析新方法(图1)。与传统的碘乙酰胺探针相比,1-OH-Az 探针由于与衣康酸具有相似的巯基反应机理,因此其对半胱氨酸的标记更容易被衣康酸所竞争。基于此探针,作者发展了竞争性 isoTOP-ABPP 技术,用于衣康酸修饰位点的组学鉴定。该技术的大致流程是:(1)在巨噬细胞裂解液中加入特定浓度的衣康酸,相同裂解液中

加入等量的 DMSO 作为对照;(2)两组样品中分别加入 1-OH-Az 探针进行半胱氨酸标记;(3)两组样品分别与轻、重同位素标记的可切割炔基生物素探针进行“点击化学”(click chemistry)反应,反应结束后将两组样品混合;(4)生物素标记的蛋白被链霉亲和素磁珠(streptavidin beads)所富集;(5)富集的蛋白被胰蛋白酶切割为肽段,修饰肽段会保留在磁珠上;(6)修饰肽段通过第二次与胰蛋白酶正交的切割反应从磁珠上释放,并通过液相色谱与串联质谱联用(LC-MS/MS)对修饰肽段进行定性和定量分析。如果某个半胱氨酸的 1-OH-Az 探针标记在加入衣康酸后显著减少,说明该位点上存在衣康酸修饰,并且标记减少的程度可以反映该位点上衣康酸的相对修饰水平。

利用该方法,作者首次实现了衣康酸在巨噬细胞蛋白质组内的半胱氨酸修饰位点的大规模鉴定。该组学数据不仅涵盖了此前无富集蛋白质组学所鉴定的 8 个衣康酸修饰位点中的 6 个,而且另外发现了 250 多个高置信度的衣康酸修饰新靶点,其中包括了糖酵解通路中的 3 个关键酶 ALDOA、GAPDH 和 LDHA。其中,最上游的 ALDOA 在其第 73 位和 339 位半胱氨酸上被衣康酸所修饰,而作者也通过质谱验证了 ALDOA 的这两个位点上都存在内源的衣康酸修饰。值得一提的是,这两个位点虽然在

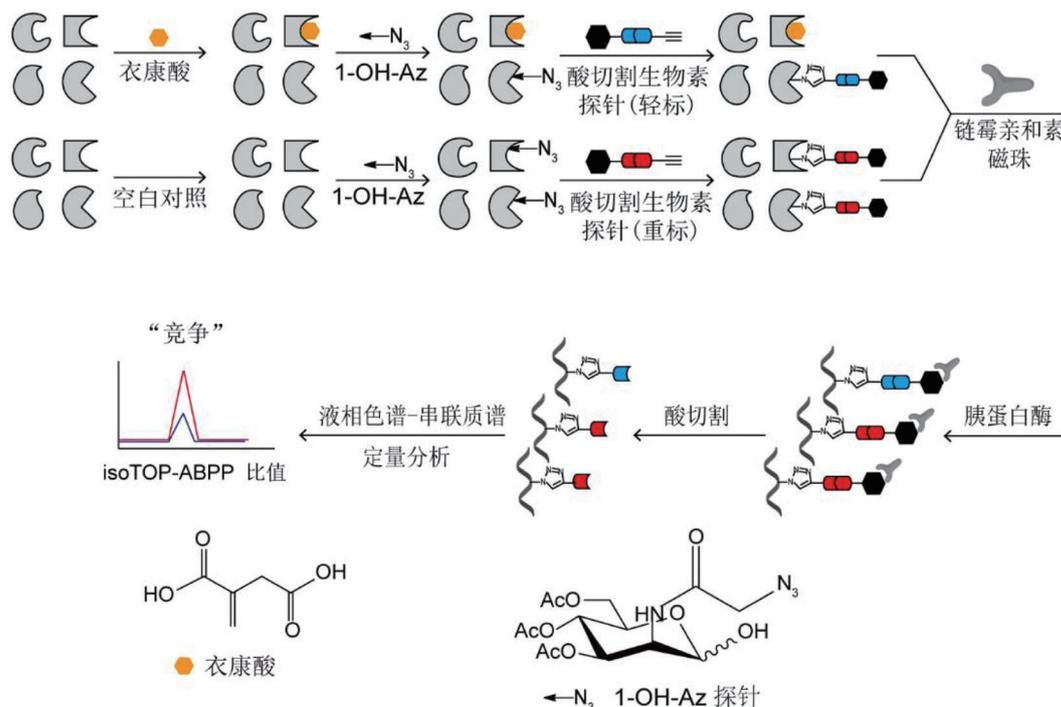


图1 基于1-OH-Az探针的竞争性isoTOP-ABPP技术大规模鉴定衣康酸修饰半胱氨酸

序列上相隔甚远,但在空间结构上却非常的邻近。进一步研究证明,衣康酸在 ALDOA 上的修饰能够显著抑制 ALDOA 的活性,并干扰糖酵解过程。除了巨噬细胞,衣康酸对 ALDOA 和糖酵解的抑制作用在压力条件下的精子细胞中也被进一步验证^[36]。与此同时,近年另一项研究表明衣康酸类似物 4-octyl itaconate (4-OI) 也可以通过修饰 GAPDH 从而抑制糖酵解^[22]。

3 衣康酸生物正交探针实现对衣康酸修饰位点的直接鉴定

虽然基于 1-OH-Az 半胱氨酸探针的竞争性 isoTOP-ABPP 技术首次提供了衣康酸修饰位点的大规模数据,但该方法并没有直接鉴定到衣康酸的修饰位点,在灵敏度和特异性上也存在着局限性。首先,1-OH-Az 探针并不能标记所有的半胱氨酸,因此探针标记以外的半胱氨酸上的衣康酸修饰无法被检测。其次,即使在 1-OH-Az 能够标记的半胱氨酸位点上,修饰程度较低的衣康酸修饰也可能无法有效地竞争探针的标记。再次,衣康酸在特定半胱氨酸位点上的修饰可能也会影响其邻近的其他半胱氨酸上的探针标记,从而导致衣康酸修饰位点的错误鉴定。最后,该技术只能在细胞裂解液中进行,因此并不能最真实地反映衣康酸在活细胞中的修饰底物。

为了在活细胞水平上直接捕捉衣康酸修饰蛋白,北京大学王初课题组进一步发展了衣康酸生物正交探针 ITalk^[23]。ITalk 探针的结构与衣康酸类似物 4-OI 类似,保留了衣康酸的半胱氨酸反应基团

(图 2)。同时,通过在 ITalk 探针上引入生物正交报告基团,从而可以利用点击化学实现对衣康酸修饰蛋白的富集。该探针具有与衣康酸及其类似物 4-OI 类似的抗炎活性和糖酵解抑制作用,并能成功捕获已知的衣康酸修饰蛋白。ITalk 探针成功鉴定了更广泛的衣康酸修饰蛋白及位点,为进一步探索衣康酸的调控机制提供了丰富的数据库。基于该数据库,进一步的实验表明衣康酸可以修饰细胞坏死通路中的关键酶 RIPK3,影响其激酶活性并参与对细胞坏死的调控。

基于 ITalk 探针的定量化学蛋白质组学分析发现,很多重要免疫调节通路中的关键蛋白被衣康酸所修饰,包括炎性小体组成蛋白 NLRP3 和细胞焦亡关键蛋白 GSDMD。在此之后,Hooftman 等^[24]证明 NLRP3 第 548 位半胱氨酸上确实存在衣康酸修饰,而该修饰可以抑制炎性小体的活化。Bambouskova 等^[25]也发现 GSDMD 第 77 位半胱氨酸上的衣康酸修饰介导了晚期 NLRP3 炎性小体活化的耐受性。这些功能探索进一步验证了衣康酸修饰蛋白数据库的可靠性。

由于衣康酸修饰目前还缺乏特异性抗体,因此在生化实验中验证特定蛋白的衣康酸修饰还非常困难,而 ITalk 探针提供了一个方便快捷技术工具,可以用于在生化水平上验证衣康酸修饰位点。例如,虽然 RIPK3 蛋白上被发现含有 3 个衣康酸修饰位点,但只有突变第 360 位半胱氨酸才能显著抑制 RIPK3 蛋白上的 ITalk 探针标记,因此证明该半胱氨酸是主要的衣康酸修饰位点^[23]。Runtsch 等^[26]也利用 ITalk 探针验证了激酶 JAK1 上的衣康酸修饰,

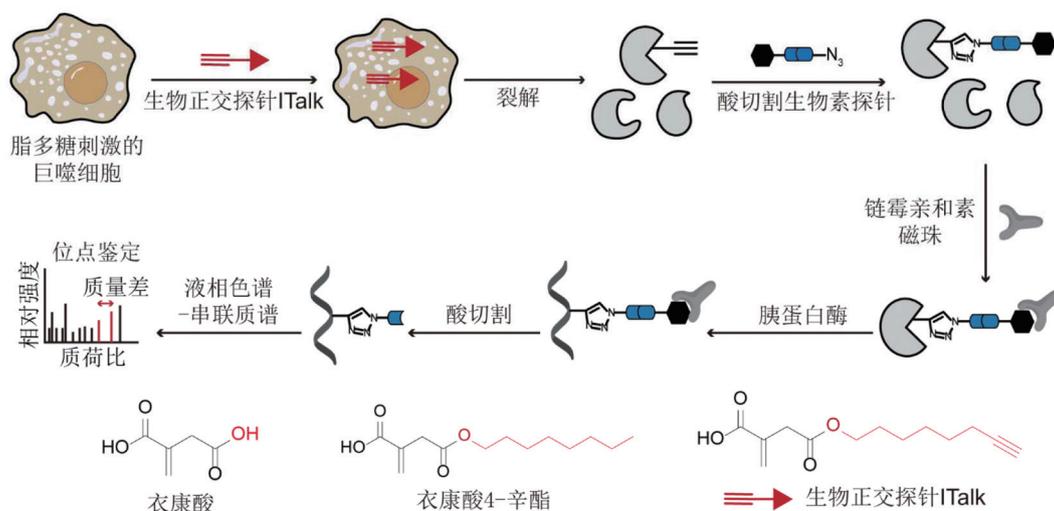


图 2 ITalk 探针实现活细胞中衣康酸修饰位点的直接鉴定

并因此发现该修饰可以介导衣康酸对 M2 型巨噬细胞活化的抑制作用。

与巨噬细胞相比,衣康酸对细菌中蛋白质的共价修饰和功能影响还没有被广泛研究。目前普遍认为衣康酸可以作为底物类似物以竞争性的形式抑制特定代谢酶的活性(例如异柠檬酸裂解酶)^[37]。通过发展新型衣康酸生物正交探针 C3A, Zhang 等^[38]首次在沙门氏菌中对衣康酸修饰蛋白进行了大规模组学鉴定,发现其中最为显著的修饰靶标蛋白是异柠檬酸裂解酶。后续的生化实验证明,衣康酸可以通过对异柠檬酸裂解酶活性位点第 195 位半胱氨酸上的共价修饰抑制酶活并介导其抗菌活性。

4 衣康酸修饰的生物学功能

衣康酸在巨噬细胞等免疫细胞中参与对多种通路的调控,包括转录、代谢和细胞程序性死亡等^[39]。除了免疫炎症调节功能之外,近年来衣康酸也被报道具有显著的抗菌和抗病毒功能。衣康酸可以抑制多种病原菌在宿主细胞内的复制,包括结核杆菌和沙门氏菌等^[40]。在抗病毒方面,过表达 IRG1 或加入衣康酸可以显著抑制寨卡病毒、流感病毒和新型冠状病毒 SARS-CoV-2 等病毒对宿主细胞的侵染^[41]。而衣康酸修饰及其底物的发现,为理解衣康酸复杂的生物学功能提供了新的思路。

衣康酸被报道通过修饰多个底物蛋白参与转录调控,其中最为经典的通路是衣康酸通过修饰 KEAP1 激活 NRF2 转录^[28]。NRF2 作为一个重要的控制细胞内氧化还原环境的转录因子,促进了多个抗氧化和抗炎因子的表达,并最终抑制干扰素响应通路。另外,衣康酸对转录因子 TFEB 的修饰促进了其核定位和转录过程,从而促进溶酶体的生物合成,并抑制病原菌对宿主的侵染^[27]。

巨噬细胞在炎症刺激下会发生代谢重编程,氧化磷酸化过程会被显著抑制,而糖酵解水平会显著升高^[3-4]。高水平的糖酵解有利于巨噬细胞在炎症状态下执行其生物学功能,而小分子药物可以通过抑制巨噬细胞糖酵解水平而实现抗炎作用^[42]。糖酵解水平的升高也为衣康酸的合成提供了大量的前体,而衣康酸可以反过来通过修饰糖酵解关键酶而抑制糖酵解水平^[21-22]。该负反馈调节机制有效地控制了巨噬细胞内的代谢网络,并介导了衣康酸的抗炎活性。另外,在 M2 型巨噬细胞活化过程中,衣康酸对 JAK1 的修饰抑制了 STAT6 的磷酸化激活和氧化磷酸化水平^[43]。最新研究表明,衣康酸也可以

抑制 CD8⁺ T 细胞中的天冬氨酸和丝氨酸/甘氨酸的生物合成^[44],虽然衣康酸修饰在此过程中的作用还不清楚。

衣康酸也广泛参与对多种程序性死亡过程的调控,包括细胞凋亡、坏死、焦亡和铁死亡等^[45]。其中,细胞坏死过程中的关键蛋白 RIPK3 和焦亡过程中的关键蛋白 GSDMD 都被报道具有衣康酸修饰^[46-47],并潜在地影响了巨噬细胞在炎症刺激下的死亡过程。由于细胞坏死和焦亡等过程中细胞会释放大量的炎性因子^[48],衣康酸对细胞死亡的调控可能成为其抗炎活性的新机制。然而,由于细胞死亡通路的复杂性,目前关于衣康酸修饰对细胞死亡调控的具体过程还有待进一步研究。

5 展望

化学蛋白质组学技术为挖掘衣康酸修饰蛋白并解析衣康酸调控机制提供了强有力的技术支持。但无论是竞争性 isoTOP-ABPP 技术还是衣康酸探针策略,它们都需要外源加入衣康酸或其类似物,无法检测内源的衣康酸修饰。因此,对以上方法鉴定到的特定修饰蛋白进行功能探索前,最好能够通过免疫沉淀的方法鉴定该蛋白上的内源衣康酸修饰,以排除由于外源衣康酸或类似物带来的潜在的非特异性干扰。值得注意的是,ITalk 的化学结构与 4-OI 类似,而最新的研究表明 4-OI 可能在反应活性和特定生物学功能上与天然的衣康酸存在着一定的差异^[49]。因此,未来发展直接捕捉内源衣康酸修饰的蛋白质组学方法尤为重要。潜在的策略包括发展特异性结合衣康酸修饰肽段的抗体,或者与衣康酸进行特异性化学反应的化学捕捉探针。这样的方法可以实现定量分析衣康酸修饰在特定炎症响应过程中的动态变化,并将会显著推动对衣康酸功能的探索。

虽然化学蛋白质组学成功揭示了上千个潜在的衣康酸修饰蛋白,但如何从庞大的数据库中挖掘出功能性的衣康酸修饰也非常具有挑战性。尤其是衣康酸的修饰过程不受酶的调控,从而可能存在一些随机的非特异性的修饰蛋白。因此,除了发展衣康酸修饰位点的鉴定方法,发展挖掘功能性衣康酸修饰的组学方法将更具指导意义。鉴于非特异的无酶催化修饰通常会具有较低的修饰程度^[50],一个潜在的策略是通过定量分析衣康酸修饰的修饰率,选取修饰率较高的靶标蛋白进行功能分析。另外,可以通过结合例如热稳定性分析技术^[51]等功能蛋白质组学技术,挖掘潜在的衣康酸调控蛋白。综上所述,

发展新型化学蛋白质组学策略将会进一步推动对衣康酸修饰靶标功能的理解, 促进衣康酸调控免疫活性的分子机制研究。

[参 考 文 献]

- [1] Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 2016, 148: 125-39
- [2] Heckmann BL, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. *J Cell Sci*, 2019, 132: jcs.222984
- [3] Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*, 2015, 25: 771-84
- [4] van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol*, 2017, 38: 395-406
- [5] Pålsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*, 2015, 21: 65-80
- [6] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 2013, 496: 238-42
- [7] Arts RJW, Novakovic B, ter Horst R, et al. Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell Metab*, 2016, 24: 807-19
- [8] Liu PS, Wang H, Li X, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol*, 2017, 18: 985-94
- [9] Murphy MP, O'Neill LAJ. Krebs cycle reimaged: the emerging roles of succinate and itaconate as signal transducers. *Cell*, 2018, 174: 780-4
- [10] Shin JH, Yang JY, Jeon BY, et al. ¹H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res*, 2011, 10: 2238-47
- [11] Strelko CL, Lu W, Dufort FJ, et al. Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 16386-9
- [12] Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 7820-5
- [13] Daniels BP, Kofman SB, Smith JR, et al. The nucleotide sensor ZBP1 and kinase RIPK3 induce the enzyme IRG1 to promote an antiviral metabolic state in neurons. *Immunity*, 2019, 50: 64-76.e4
- [14] Shen H, Campanello GC, Flicker D, et al. The human knockout gene CLYBL connects itaconate to vitamin B12. *Cell*, 2017, 171: 771-82.e11
- [15] Sasikaran J, Ziemski M, Zadora PK, et al. Bacterial itaconate degradation promotes pathogenicity. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 371-7
- [16] Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab*, 2016, 24: 158-66
- [17] Kulkarni RA, Bak DW, Wei D, et al. A chemoproteomic portrait of the oncometabolite fumarate. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 391-400
- [18] Blewett MM, Xie J, Zaro BW, et al. Chemical proteomic map of dimethyl fumarate-sensitive cysteines in primary human T cells. *Sci Signal*, 2016, 9: rs10
- [19] Unni S, Deshmukh P, Krishnappa G, et al. Structural insights into the multiple binding modes of dimethyl fumarate (DMF) and its analogs to the Kelch domain of Keap1. *FEBS J*, 2021, 288: 1599-613
- [20] Bambouskova M, Gorvel L, Lampropoulou V, et al. Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I κ B ζ -ATF3 inflammatory axis. *Nature*, 2018, 556: 501-4
- [21] Qin W, Qin K, Zhang Y, et al. S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 983-91
- [22] Liao ST, Han C, Xu DQ, et al. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to exert anti-inflammatory effects. *Nat Commun*, 2019, 10: 5091
- [23] Qin W, Zhang Y, Tang H, et al. Chemoproteomic profiling of itaconation by bioorthogonal probes in inflammatory macrophages. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 10894-8
- [24] Hooftman A, Angiari S, Hester S, et al. The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits inflammasome activation. *Cell Metab*, 2020, 32: 468-78.e7
- [25] Bambouskova M, Potuckova L, Paulenda T, et al. Itaconate confers tolerance to late NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep*, 2021, 34: 108756
- [26] Runtsch MC, Angiari S, Hooftman A, et al. Itaconate and itaconate derivatives target JAK1 to suppress alternative activation of macrophages. *Cell Metab*, 2022, 34: 487-501.e82
- [27] Zhang Z, Chen C, Yang F, et al. Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity. *Mol Cell*, 2022, 82: 2844-57.e10
- [28] Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*, 2018, 556: 113-7
- [29] Qin W, Yang F, Wang C. Chemoproteomic profiling of protein-metabolite interactions. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 54: 28-36
- [30] Zhang Y, Qin W, Wang C. Discovery of post-translational modifications in immunometabolism by chemical proteomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 68: 37-43
- [31] Nomura DK, Dix MM, Cravatt BF. Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 630-8
- [32] Weerapana E, Wang C, Simon GM, et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, 2010, 468: 790-5
- [33] Wang C, Weerapana E, Blewett MM, et al. A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived

- electrophiles. *Nat Methods*, 2014, 11: 79-85
- [34] Grossman EA, Ward CC, Spradlin JN, et al. Covalent ligand discovery against druggable hotspots targeted by anti-cancer natural products. *Cell Chem Biol*, 2017, 24: 1368-76.e4
- [35] Qin W, Qin K, Fan X, et al. Artificial cysteine S-glycosylation induced by per-O-acetylated unnatural monosaccharides during metabolic glycan labeling. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57: 1817-20
- [36] Zhu Z, Umehara T, Tsujita N, et al. Itaconate regulates the glycolysis/pentose phosphate pathway transition to maintain boar sperm linear motility by regulating redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159: 44-53
- [37] Rittenhouse JW, McFadden BA. Inhibition of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera* by itaconate. *Arch Biochem Biophys*, 1974, 163: 79-86
- [38] Zhang Y, Qin W, Liu D, et al. Chemoproteomic profiling of itaconations in *Salmonella*. *Chem Sci*, 2021, 12: 6059-63
- [39] McGettrick AF, O'Neill LA. Two for the price of one: itaconate and its derivatives as an anti-infective and anti-inflammatory immunometabolite. *Curr Opin Immunol*, 2022, 80: 102268
- [40] Cordes T, Michelucci A, Hiller K. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu Rev Nutr*, 2015, 35: 451-73
- [41] O'Carroll SM, O'Neill LAJ. Targeting immunometabolism to treat COVID-19. *Immunother Adv*, 2021, 1: ltab013
- [42] Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, et al. Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science*, 2018, 360: 449-53
- [43] Runtsch MC, Angjari S, Hooftman A, et al. Itaconate and itaconate derivatives target JAK1 to suppress alternative activation of macrophages. *Cell Metab*, 2022, 34: 487-501.e8
- [44] Zhao H, Teng D, Yang L, et al. Myeloid-derived itaconate suppresses cytotoxic CD8⁺ T cells and promotes tumour growth. *Nat Metab*, 2022, 4: 1660-73
- [45] Shi J, Cai C. Research progress on the mechanism of itaconate regulating macrophage immunometabolism. *Front Immunol*, 2022, 13: 937247
- [46] Qin W, Zhang Y, Tang H, et al. Chemoproteomic profiling of itaconation by bioorthogonal probes in inflammatory macrophages. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 10894-8
- [47] Bambouskova M, Potuckova L, Paulenda T, et al. Itaconate confers tolerance to late NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep*, 2021, 34: 108756
- [48] Robinson N, Ganesan R, Hegedüs C, et al. Programmed necrotic cell death of macrophages: focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol*, 2019, 26: 101239
- [49] Swain A, Bambouskova M, Kim H, et al. Comparative evaluation of itaconate and its derivatives reveals divergent inflammasome and type I interferon regulation in macrophages. *Nat Metab*, 2020, 2: 594-602
- [50] Weinert BT, Moustafa T, Iesmantavicius V, et al. Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J*, 2015, 34: 2620-32
- [51] Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science*, 2014, 346: 1255784