

DOI: 10.13376/j.cbls/2023018

文章编号: 1004-0374(2023)02-0123-09

· 评述与综述 ·

非组蛋白巴豆酰化修饰的生物学功能研究进展

庞攀攀¹, 杨铁花¹, 郑永唐², 郑昌博^{3*}

(1 云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室, 昆明 650500;

2 中国科学院昆明动物研究所, 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明 650223;

3 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 赖氨酸巴豆酰化是一种新近发现的蛋白质翻译后修饰类型, 在基因表达、细胞代谢及疾病治疗等许多病理生理过程中都具有重要的调节意义, 可能是潜在的药物新靶标。目前研究多关注于组蛋白巴豆酰化修饰, 而非组蛋白巴豆酰化修饰的研究逐渐被重视。本文简要介绍非组蛋白巴豆酰化修饰的生物学功能及其在疾病中的作用, 将有助于了解非组蛋白巴豆酰化修饰的功能和机制。

关键词: 非组蛋白巴豆酰化; 翻译后修饰; 生物学功能; 疾病

中图分类号: Q51 **文献标志码:** A

Progress in biological functions of crotonylation modification of non-histone proteins

PANG Pan-Pan¹, YANG Tie-Hua¹, ZHENG Yong-Tang², ZHENG Chang-Bo^{3*}

(1 College of Chinese Materia Medica & Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2 Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3 School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: Lysine crotonylation is a newly discovered type of protein post-translational modification, which has important regulatory significance in many pathophysiological processes such as gene expression, cell metabolism and disease treatment, and may be a potential new drug target. At present, most of the research focuses on histone crotonylation modification, while the research on non-histone crotonylation modification has gradually attracted more attention. In this paper, we briefly introduce the biological function of non-histone crotonylation modifications and their role in diseases, aiming to help to understand the function and mechanisms of non-histone crotonylation modifications.

Key words: non-histone crotonylation; post-translational modification; biological function; disease

蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)是参与DNA复制、转录、细胞分化和组织发育等多种生物学过程的重要表观遗传调控机制^[1]。赖氨酸酰化修饰(lysine acylation)是一种广泛存在的、进化上高度保守的蛋白质翻译后修饰。现已鉴定出多种赖氨酸酰化作用,包括乙酰化(lysine acetylation, Kac)、丙酰化(lysine propionylation, Kpr)、丙二酰化(lysine malonylation, Kmal)、丁酰化(lysine

butyrylation, Kbu)、戊二酰化(lysine glutarylation, Kglu)、巴豆酰化(lysine crotonylation, Kcr)、苯甲酰化(lysine benzoylation, Kbz)、2-羟基异丁酰化(lysine

收稿日期: 2022-07-26; 修回日期: 2022-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(8196130122); 云南省基础研究计划(202101AT070154); 云南省科技人才和平台计划(202105AG070012)

*通信作者: E-mail: zhengchangbo@kmmu.edu.cn

2-hydroxyisobutyrylation, Khib)、 β -羟基丁酰化 (lysine β -hydroxybutyrylation, Kbbh)、琥珀酰化 (lysine succinylation, Ksucc)、乳酸化 (lysine lactation, Kla)^[2] 和异烟酰化 (lysine isonicotinylation, Kinic)^[3] 等。巴豆酰化修饰是一种新型而且作用广泛的赖氨酸酰化修饰, 它可以通过调节组蛋白的结构和功能, 在多种疾病中发挥关键作用, 如急性肾损伤、抑郁症、HIV 潜伏期、肥厚性心肌病和癌症等^[4]。研究发现, 细胞中的非组蛋白也存在巴豆酰化修饰, 并且非组蛋白的巴豆酰化修饰调控参与了几乎所有的生物学过程和疾病发生发展过程^[5]。本文结合笔者实验室的研究, 通过对非组蛋白巴豆酰化的生物学功能及相关疾病的研究进展进行简要综述, 为了解其生物医学意义和前景提供参考。

1 赖氨酸的巴豆酰化修饰

巴豆酰化修饰是一种进化上保守的赖氨酸酰化修饰。它是由巴豆酰基转移酶以巴豆酰辅酶 A (crotonyl-CoA, Cr-CoA) 作为底物, 将巴豆酰基团传递到赖氨酸残基上的一种共价修饰。这种修饰通常出现在基因启动子区和增强子区, 提示组蛋白的赖氨酸巴豆酰化可能是基因表达活跃的一个指标^[6]。组蛋白巴豆酰化修饰在基因表达、细胞代谢、疾病治疗等许多病理生理过程中都发挥重要的调控作用^[7]。近年研究表明, 数量众多且不同类型的非组蛋白受到巴豆酰化修饰调控, 并在不同物种中广泛表达^[8-9]。越来越多的蛋白质组学及修饰组学分析表明, 非组蛋白巴豆酰化的修饰频率非常高, 这些蛋白质修饰参与了许多关键的细胞生物学过程, 与细胞的生理功能和病变发生密切相关, 因此可能是潜在和重要的药物新靶标。进一步研究非组蛋白巴豆酰化修饰将为赖氨酸巴豆酰化修饰的功能研究和动态调控提供丰富的理论依据, 也为疾病预防和治疗提供关键依据。

2 巴豆酰化的调节

巴豆酸是一种由结肠微生物群产生的短链脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFA)。巴豆酸在生物体内以巴豆酸盐 (crotonate) 的形式被细胞或组织摄取。巴豆酸盐通过酰基辅酶 A 合成酶短链家族成员 2 (acyl-CoA synthetase short-chain family member 2, ACSS2) 转化为巴豆酰辅酶 A。丁酸盐可通过脂肪酸 β -氧化途径 (β -oxidation pathway) 转化为丁酰辅酶 A (butyryl-CoA), 并通过支链氨基酸脱氢酶

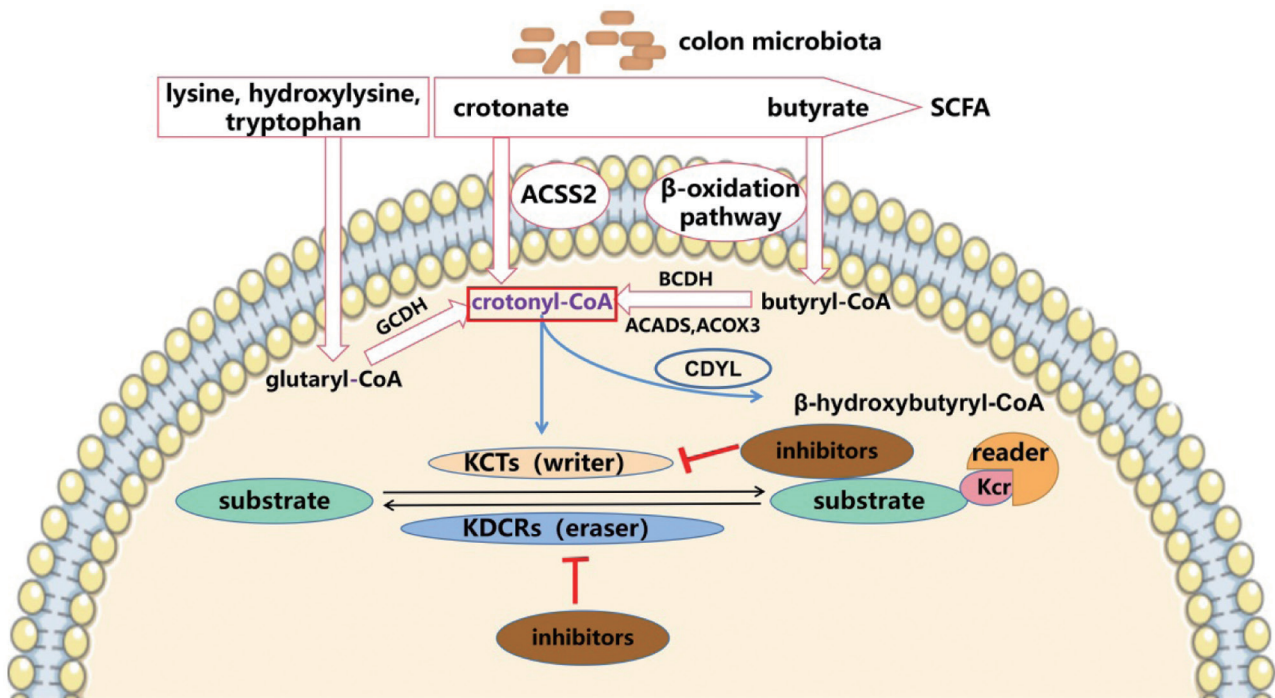
(branched-chain amino acid dehydrogenase, BCDH) 进一步转化为巴豆酰辅酶 A^[10]。在脂肪酸氧化过程中催化丁酰辅酶 A 转化为巴豆酰辅酶 A 的短链特异性酰基辅酶 A 脱氢酶 (short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, ACADS) 和过氧化物酶体酰基辅酶 A 氧化酶 3 (peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3, ACOX3) 被证明是内胚层分化过程中关键的巴豆酰辅酶 A 的产生者^[11]。在赖氨酸 (lysine)、 β -羟基赖氨酸 (hydroxylysine) 和色氨酸 (tryptophan) 的氨基酸代谢中, 戊二酰辅酶 A 脱氢酶 (glutaryl-CoA dehydrogenase, GCDH) 催化戊二酰辅酶 A (glutaryl-CoA) 氧化为巴豆酰辅酶 A 和 CO_2 ^[12]。染色质结构域 Y 样转录共抑制子 (chromo domain Y like, CDYL) 作为巴豆酰辅酶 A 水合酶, 可将巴豆酰辅酶 A 转化为 β -羟基丁酰辅酶 A (β -hydroxybutyryl-CoA), 并对 Kcr 水平进行负调控^[13]。

在蛋白质进行巴豆酰化的过程中, 赖氨酸巴豆酰转移酶 (lysine crotonyl transferase, KCT)(书写器, writer) 以巴豆酰辅酶 A 作为底物 (substrate), 将巴豆酰基添加到底物蛋白上^[8], 并且被 YEATS2、AF9、Taf14 等另一类蛋白家族 (读取器, reader) 所识别, 启动一系列的下游信号^[14]。在 PTM 诱导的信号转导结束时, 大多数巴豆酰化也可被赖氨酸去巴豆酰化酶 (lysine descrotonylase, KDCR)(擦除器, eraser) 去除^[8,15]。曲古柳菌素 A (trichostatin A, TSA)、烟酰胺 (nicotinamide, NAM)、辛二酰苯胺异羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 和 Panobinostat (LBH589) 等选择性抑制剂 (inhibitors) 可抑制 KCT 或 KDCR 的部分作用 (图 1)。

目前已知的赖氨酸巴豆酰转移酶包括 MYST (Moz、Ybf2、Sas2 和 Tip60)、p300/CREB 结合蛋白 (p300/CBP) 和 GNAT (GCN5 相关 N 乙酰转移酶) 家族等^[16]。赖氨酸去巴豆酰化酶包括 HDAC class I (HDAC1、2、3 和 8) 和 HDAC class III (Sirt1、2 和 3)^[15]。巴豆酰化的读取器主要包括 YEATS 结构域、溴结构域和 DPF 结构域家族, 可识别巴豆酰化修饰, 从而发挥其生理病理功能^[17]。随着非组蛋白巴豆酰化研究的深入, 发现非组蛋白和组蛋白巴豆酰化的去巴豆酰化酶和巴豆酰转移酶并不完全重叠 (表 1)。

3 非组蛋白巴豆酰化的生物学功能

由于带正电荷的赖氨酸残基参与了蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质催化活性, 而巴豆酰化中和了赖氨酸的正电荷, 影响了蛋白质功能。不同蛋白



colon microbiota: 结肠菌群; SCFA: short-chain fatty acid, 短链脂肪酸; crotonate: 巴豆酸盐; butyrate: 丁酸盐; lysine: 赖氨酸; hydroxylysine: 羟赖氨酸; tryptophan: 色氨酸; ACSS2: acyl-CoA synthetase short-chain family member 2, 酰基辅酶A合成酶短链家族成员2; β -oxidation pathway: β -氧化途径; GCDH: glutaryl-CoA dehydrogenase, 戊二酰辅酶A脱氢酶; BCDH: branched-chain amino acid dehydrogenase, 支链氨基酸脱氢酶; ACADS: short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, 短链特异性酰基辅酶A脱氢酶; ACOX3: peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3, 过氧化物酶体酰基辅酶A氧化酶3; glutaryl-CoA: 戊二酰辅酶A; butyryl-CoA: 丁酰辅酶A; crotonyl-CoA: 巴豆酰辅酶A; CDYL: chromo domain Y like, 染色质结构域Y样转录共抑制子; β -hydroxybutyryl-CoA: β -羟基丁酰辅酶A; KCTs: lysine crotonyl transferase, 赖氨酸巴豆酰转移酶; KDCRs: lysine descrotonylase, 赖氨酸去巴豆酰化酶; substrate: 底物; inhibitors: 抑制剂; Kcr: lysine crotonylation, 赖氨酸巴豆酰化。

图1 赖氨酸巴豆酰化的代谢途径

质的巴豆酰化可能影响不同的生物学功能, 如基因转录、DNA 修复、代谢途径、蛋白质活性调节、细胞周期、异染色质的定位和 MTORC1 的调控 (表 2)。

3.1 基因转录

虽然对巴豆酰化在基因转录中作用的认识主要来自组蛋白, 但非组蛋白巴豆酰化在基因转录中的作用研究也越来越多。如 P53 是一种肿瘤抑制蛋白, 它能转录激活靶基因, 从而调节细胞周期、细胞凋亡和 DNA 修复等关键细胞过程^[32]。巴豆酸 (crotonic acid, CA) 会通过靶向 P53 的 Ser46 诱导其巴豆酰化, 减弱其对靶基因的转录调控^[29]。此外, 组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 属于 I 类组蛋白去乙酰化酶家族成员, 它可以通过与染色质调节蛋白发生相互作用, 从而参与调控基因表达和细胞分化等过程^[34]。HDAC1 不仅可以催化底物组蛋白赖氨酸的去巴豆酰化, 其自身还可以发生巴豆酰

化, 降低转录因子 SOX-2、八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4) 和 Nanog 的表达, 从而抑制由这些转录因子激活的基因转录^[15]。

3.2 DNA 修复

除了 DNA 复制错误等自发突变以外, 某些化学成分和电离辐射等环境因素也会导致基因突变或 DNA 损伤^[35]。为了应对大量的内源性和外源性 DNA 损伤, 细胞进化出了相互交织但高度协调的 DNA 损伤反应 (DNA damage response, DDR) 网络, 包括感知 DNA 损伤并激活下游细胞通路修复受损 DNA 的信号级联反应^[36]。巴豆酰化修饰的非组蛋白通过标记受损 DNA, 刺激 DNA 损伤反应蛋白富集到 DNA 断裂点, 从而促进 DNA 修复。

复制蛋白 A (replication protein A, RPA) 作为真核细胞中的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 结合蛋白, 在减数分裂的 DNA 代谢中起关键作用,

表1 巴豆酰化的书写器(writer)、擦除器(eraser)、读取器(reader)

	家族	目标蛋白	酶	参考文献	
Writer	p300/CBP家族	组蛋白	p300、CBP	[18]	
		NPM1、DDX5	CBP	[8]	
	MYST家族	组蛋白	MOF、Esa1	[16]	
			Esa1-Yng2-Epl1 (Pciccolo NuA4)复合物	[19]	
	GNAT家族	NPM1	MOF	[8]	
		组蛋白	Gcn5、Hat1	[20]	
Eraser	HDAC I 家族	组蛋白	HDAC3-NCoR1	[21]	
			HDAC1、2、3、8	[15]	
			HDAC1、2、3	[22]	
			HDAC1、2	[23]	
	HDAC III家族	组蛋白	NPM1	HDAC1、3	[8]
				SIRT1、2	[24]
				SIRT1、2、3	[25]
				SIRT1	[15]
Reader	YEATS域系列	组蛋白	AF9、ENL、Yaf9、Taf14	[17]	
			YEATS2	[26]	
			Taf14	[20]	
	DPF域家族 溴域系列			MOZ、DPF2	[27]
				BRD9、TAF1	[28]

表2 非组蛋白巴豆酰化的生物学功能

生物学功能	实验条件	研究的模型	参考文献
基因转录	细胞培养	293T细胞	[15]
	CA处理	RKO/H460细胞	[29]
DNA修复	CDYL敲除	HeLa细胞	[13]
代谢途径	细胞培养	H1299细胞	[8]
	无任何处理	番木瓜果实	[30]
	NH ₄ ⁺ 缺乏/再补给	茶树	[31]
蛋白质活性调节	CA处理	RKO/H460细胞	[29]
	NaCr处理	HeLa细胞	[32]
异染色质的定位	NaCr/TSA处理	HeLa细胞	[32]
细胞周期	NaCr处理	HeLa细胞	[32]
MTORC1的调控	细胞培养	HEK 293T细胞	[33]

如 DNA 复制、修复、同源重组等。人类 RPA 是由 RPA1、RPA2 和 RPA3 组成的异源三聚体。其中，RPA1 负责 ssDNA 和 DNA 代谢相关因子的结合和相互作用，在 DNA 修复中起重要作用^[37]。RPA1 在 DNA 代谢过程中受乙酰化、磷酸化、泛素化、类泛素化等多种 PTMs 的调控^[38]。在 DNA 双链损伤中，RPA1 的巴豆酰化修饰水平升高，从而增强 RPA1 与 ssDNA 的结合，使 RPA1 被招募到 DNA 损伤部位，同时还增强 RPA1 与同源重组酶 (BLM、DNA2L、Mre11、NBS1 和 RAD51) 的相互作用，并

促进 DNA 损伤条件下的细胞存活和抗凋亡^[13]。

3.3 代谢途径

基于 GO、KEGG 和 Pfam 数据库的富集分析表明，巴豆酰化蛋白在多种生物代谢过程中富集，包括运输、杂环代谢过程和含碱基的化合物代谢过程，同时巴豆酰化蛋白与多种代谢途径相关，包括核糖体、剪接体、蛋白酶体途径和帕金森病发生发展过程^[8]。对人体样品进行生物信息学研究发现，大量的巴豆酰化非组蛋白在广泛的代谢过程中发挥重要作用，而且与代谢途径相关的巴豆酰化蛋白在

不同种属中具有广泛的意义^[30]。采用高分辨率液相色谱串联质谱技术(LC-MS/MS)结合高灵敏度的免疫亲和抗体进行分析发现,植物中的非组蛋白巴豆酰化修饰参与了碳代谢、三羧酸循环、抗生素生物合成、氨基酸生物合成、光合作用和糖酵解等途径^[30-31,39]。在木瓜不同的氨基酸代谢通路中发现了40种不同的巴豆酰化酶,而且在许多涉及激素信号转导及细胞壁代谢途径的蛋白质中都存在巴豆酰化修饰位点^[30]。

3.4 蛋白质活性调节

通过特异性抗体富集和高分辨率质谱分析,已经鉴定出了数百个巴豆酰化蛋白和赖氨酸残基。生物信息学分析显示,巴豆酰化富集于核蛋白中,参与多个生理过程^[32]。HeLa细胞经巴豆酸钠(NaCr)处理后,巴豆酰化水平显著增加。虽然HDAC1在HeLa细胞中的表达不受NaCr或HDAC抑制剂TSA和NAM联合处理的影响,但与未修饰的HDAC1相比,NaCr会增强HDAC1的巴豆酰化,使其在组蛋白底物上的去乙酰化酶活性降低^[32]。此外,巴豆酰化可降低P53蛋白的活性,从而增强P53依赖的糖酵解活性和DNA损伤应激导致的癌细胞增殖^[29]。这些研究证明了巴豆酰化在蛋白质活性调节中的重要性。

3.5 异染色质的定位

异染色质是指在细胞周期中具有固缩特性的染色体,起着调控基因表达的作用。异染色质的定位对基因疾病的诊断及治疗尤为重要^[40]。相对于常染色质中基因的活跃表达,异染色质中的基因表达往往是不活跃的,而作为异染色质结构标记性蛋白,Hp1 α (CBX5)通过与甲基化组蛋白结合而富集在异染色质中,在异染色质的凝集和基因转录调控中扮演着关键的角色^[41]。Hp1 α (CBX5)巴豆酰化使HP1 α 从异染色质到核质的定位发生了改变,并减少了与甲基化H3K9的结合,而H3K9在异染色质中高度富集^[32]。这为异染色质定位改变提供了可能的解释。

3.6 细胞周期

作为组蛋白去乙酰化酶复合物的组分,泛素连接酶RNF2和结合酶UBE2E1、NCOR1、RBBP4可发生巴豆酰化,从而调控染色质和细胞周期^[32]。在后生动物中,MCM家族成员(MCM2、3、4、5、6和7)在DNA复制叉中形成一个六聚体复合体,决定DNA复制的起始^[42]。NaCr处理后,MCM3发生巴豆酰化从而导致染色质中的MCM蛋白显著减少^[32]。这表明DNA复制可能受到蛋白质巴豆酰

化的影响,进而影响细胞周期。

3.7 MTORC1的调控

MTORC1作为机体感应营养物质尤其是氨基酸最重要的信号通路之一,通过其激酶活性磷酸化不同底物,参与调控多种生理及病理过程。而氨基酸可以调控MTORC1的溶酶体定位进而影响其激活过程,迄今为止已发现多个重要的调控蛋白或蛋白质复合体在溶酶体表面调节MTORC1的溶酶体移位^[43]。最新研究将体外重构与比较蛋白质组学技术相结合,发现钙连蛋白(calnexin, CANX)是亮氨酸调控的MTORC1通路的重要调节因子:亮氨酸剥夺促进了赖氨酸乙酰转移酶7(lysine acetyltransferase 7, KAT7)介导的CANX Lys525位点的巴豆酰化,使CANX移位到溶酶体表面与溶酶体相关膜蛋白2(lysosome-associated membrane protein 2, LAMP2)结合,抑制MTORC1溶酶体移位,从而导致MTORC1活性下降^[33]。该研究结果为巴豆酰化修饰在亮氨酸激活的MTORC1通路中发挥的作用提供了新的见解。

4 非组蛋白巴豆酰化在疾病中的作用

非组蛋白巴豆酰化的错误调控与多种人类疾病有关,因此巴豆酰化相关蛋白可能是潜在的药物靶点,但由于巴豆酰化是一种新发现的翻译后修饰,其在不同疾病中的作用还需要更多的研究。

4.1 非组蛋白巴豆酰化修饰对癌症的作用

研究发现,癌症相关蛋白可通过CBP/P300受到巴豆酰化影响。通过比较p300的全局定量蛋白质组学发现,EDRN数据库中4.5%的癌症蛋白质生物标志物发生巴豆酰化;p300靶向巴豆酰化的蛋白质占COSMIC癌症基因库总基因编码的5.9%,其中6个p300靶向的巴豆酰化蛋白被证实为癌症相关蛋白^[44]。

巴豆酰化蛋白在人肿瘤组织中广泛表达^[45]。使用泛抗Kcr抗体对不同癌症患者样本进行免疫组化染色,发现赖氨酸巴豆酰化水平在肝癌、肾癌和胃癌中显著下降,而在甲状腺癌、结肠癌、食管癌、肺癌和胰腺癌中显著增加;此外,在肝细胞癌中,赖氨酸巴豆酰化也与肿瘤、淋巴结转移和分期有关^[45]。因此,巴豆酰化可能通过调控多个信号通路,在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。

敲低HDAC或加入HDAC抑制剂TSA可提高巴豆酰化水平,抑制肝细胞癌细胞增殖和迁移^[45],提示HDAC可能调控巴豆酰化。HDACs是一种重要的蛋白质修饰酶,与癌症发展密切相关,以

HDAC 为靶标的抗肿瘤药物的研发已成为研究热点。目前已有 5 种 HDAC 抑制剂被批准上市, 其中 4 种 HDAC 抑制剂 SAHA、Romidepsin (FK228)、Panobinostat (LBH589) 和 Belinostat (PXD101) 被用于皮肤和外周 T 细胞淋巴瘤以及多发性骨髓瘤的治疗^[46]。

SAHA 作为泛 HDAC 抑制剂, 可抑制 HDAC I、HDAC II a 和 HDAC II b, 被用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤^[47]。SAHA 对其他肿瘤的治疗作用也已得到证实, 如非小细胞肺癌和乳腺癌^[48]。此外, 研究人员还开发了一系列巴豆酰化识别位点上独特 π - π 结构域的抑制剂。比如 ENL YEATS 的选择性抑制剂 XL-13m 与内源性 ENL 结合后可干扰 ENL 在染色质上的募集, 协同下调 MLL 重排急性白血病中的癌基因^[49]。研究发现, HDAC I 类中的 4 种蛋白 (HDAC1、2、3、8) 在细胞内具有组蛋白去巴豆酰化修饰的作用, 并且 HDAC1 和 HDAC3 具有非组蛋白去巴豆酰化修饰活性^[15]。

4.2 非组蛋白巴豆酰化修饰对脑部疾病的作用

BTBR T~(+) tf/J (简称 BTBR) 小鼠存在中枢神经系统发育障碍和许多异常的神经解剖结构。对 BTBR 和 C57BL/6 小鼠的皮质脑组织裂解物进行蛋白质印迹分析发现, BTBR 小鼠大脑皮层整体巴豆酰化水平升高^[50], 提示巴豆酰化与脑部疾病相关。小鼠脑提取液中约 70 kDa 的蛋白可被泛巴豆酰化抗体识别, 表明脑内存在巴豆酰化的非组蛋白^[22]。

4.3 非组蛋白巴豆酰化修饰对心血管系统的调节

原肌球蛋白 3 (tropomyosin 3, TPM3) 作为一种肌动蛋白结合蛋白, 在不同组织中广泛表达^[51]。对斑马鱼胚胎进行 Kcr 全蛋白质组分析发现, TPM3 存在巴豆酰化位点^[52]。笔者实验室研究发现, 在血管平滑肌组织中, 巴豆酸能显著舒张苯肾上腺素引起的血管主动收缩, 表明巴豆酰化修饰可能调节血管舒缩。免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验也表明 TPM3 存在巴豆酰化修饰且其表达受到苯肾上腺素影响, 提示 TPM3 可能被巴豆酰化修饰调节, 调控血管病理生理。

慢性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 是全球发病率和死亡率较高的疾病。在心肌损伤后, 心肌细胞的丢失和无功能瘢痕组织的沉积可造成剩余健康心肌组织血液流通压力^[53]。基于串联质谱标签 (tandem mass tag, TMT) 标记的巴豆酰化修饰组学技术揭示急性缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤引发广泛的 Kcr, 特别是与心肌细胞收缩相关的蛋白, 包括线粒体、

细胞骨架、肌浆网和间隙连接蛋白。对 Kcr 蛋白进行的位点特异性突变和功能验证表明, 线粒体和肌丝蛋白 Kcr 在 I/R 损伤应激反应中对于心脏修复非常重要, 这为 IHD 提供了一个潜在的治疗靶点^[54]。

4.4 非组蛋白巴豆酰化修饰对肝脏代谢稳态的调节

代谢稳态是维持人体脏器正常功能的基础。由肝脏发育及代谢异常引发的功能缺陷影响全球约 20% 的人口。酰基辅酶 A 氧化酶 2 (acyl-CoA oxidase 2, Acox2) 是巴豆酰化修饰的重要调控因子, 可通过“经典的底物催化功能” (支链脂肪酸氧化和胆汁酸合成)^[55] 和“非经典途径” (维生素 B3 和巴豆酰化修饰)^[56] 参与细胞代谢调控。借助串联亲和纯化 (TAP-MS) 技术发现, Acox2 与甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶 (methylcrotonyl-CoA carboxylase, MCCC) 存在蛋白质互作并抑制其酶活性; 进一步研究发现, 在 Acox2 纯合突变小鼠脏器中, 非组蛋白巴豆酰化修饰水平显著下调, 胆管增生区域出现巴豆酰化信号的富集, 而其他酰基修饰如乙酰化没有明显变化; Acox2 纯合突变小鼠中下调的 Kcr 位点与脂质代谢催化反应密切相关, 特别是肝细胞过氧化物酶体中 Ehhadh、Crot、Scp2 等脂肪酸氧化酶的巴豆酰化位点修饰水平显著下调^[56]。

4.5 非组蛋白巴豆酰化修饰对 HIV 潜伏期的作用

蛋白质组学分析发现, 三基序蛋白 27 (tripartite motif containing 27, TRIM27) 是响应巴豆酸盐导致蛋白质巴豆酰化的重要靶标, 而 TRIM27 的巴豆酰化修饰可以通过调节 p100 裂解为 p52, 增强非经典 NF- κ B (ncNF- κ B) 信号转导通路, 进而促进 Jurkat 和 U1 细胞系模型、HIV 潜伏感染的原代 CD4⁺ T 细胞和从 HIV 感染者分离的静息 CD4⁺ T 细胞中的 HIV 潜伏期逆转^[57]。

5 巴豆酰化的鉴定与检测

酯类药物在体内的代谢需要经历复杂的生化反应, 这使得体内缺乏特异性巴豆酰化酶, 从而限制了对靶向巴豆酰化药物的进一步研究, 到目前为止仍然没有靶向巴豆酰化的药物上市, 因此使用 HDACs、KATs 和溴结构域蛋白的抑制剂进行靶向治疗成为有吸引力的治疗策略。尽管 HDACs、KATs 和溴结构域抑制剂的生物学效应通常与乙酰化有关, 但这些药物也调节巴豆酰化, 因此非组蛋白巴豆酰化有可能也参与了这些药物在体内的生物学效应。但如何特异性地靶向蛋白质巴豆酰化修饰从而进行药物设计及疾病治疗, 还需要大量的研究。随

着 LC-MS/MS 的发展, 非组蛋白巴豆酰化研究取得了较大突破。

5.1 实验方法

为了阐明不同赖氨酸酰化的作用, Wei 等^[15]和 Liu 等^[16]设计生成了 HAT 缺陷但 HCT 活性较强的 p300 I1935G 和 CBP I1432G 突变体以及 HDAC 缺乏但 HDAC 活性完整的 HDAC1/3 AGG-VRPP 突变体。2018 年, Bos 和 Muri^[58]设计了一种内源性蛋白巴豆酰化的化学探针, 作为特异性抗体的补充, 检测巴豆酰化修饰。2020 年, Spinck 等^[59]利用遗传密码扩展用赖氨酸衍生物替换乳清酸核苷 -5'-磷酸脱羧酶的一个必需的活性位点赖氨酸残基, 在酵母中设计了 HDAC-HDCR 选择系统。2021 年, Xie 等^[60]开发了通过分子内亲核交换反应产生荧光信号的单步荧光探针 (被 Sirt2 识别的 KTcr- I 和被 HDAC3 识别的 KTcr- II), 来检测 HDACs 的去巴豆酰化活性。

5.2 生物信息学工具

2017 年, Ju 和 He^[61]设计了新的编码方案, 通过数据库预测蛋白质巴豆酰化位点。2020 年, Malebary 等^[62]基于蛋白质序列的理化性质和进化衍生特征, 设计开发了新的蛋白质巴豆酰化位点数据库。Lv 等^[63]通过结合基于序列的特征、基于理化性质的特征和数值空间衍生信息, 使用了一种基于深度学习的方法, 可以准确检测赖氨酸巴豆酰化位点。

6 结语

非组蛋白巴豆酰化修饰作为一种广泛的翻译后修饰, 已被证实在基因转录、DNA 修复、代谢途径、酶的调节、异染色质定位、细胞周期和 MTORC1 的调控等生物学过程中发挥重要作用, 并参与调控癌症、脑部疾病、心血管疾病、肝脏代谢稳态和 HIV 潜伏期。但非组蛋白巴豆酰化如何影响蛋白质和细胞功能, 如何调节生理过程和相关疾病尚未阐明。随着高分辨率核磁共振、基因组学、生物信息学和选择性化学探针的综合运用与发展, 相关基础研究及靶向蛋白质巴豆酰化的药物开发将进一步加强, 从而为临床疾病治疗提供新的理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Fu J, Wu M, Liu X. Proteomic approaches beyond expression profiling and PTM analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 4051-60

[2] Jiang G, Li C, Lu M, et al. Protein lysine crotonylation: past, present, perspective. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 703

[3] Jiang Y, Li Y, Liu C, et al. Isonicotinylation is a histone mark induced by the anti-tuberculosis first-line drug isoniazid. *Nat Commun*, 2021, 12: 5548

[4] Wang S, Mu G, Qiu B, et al. The function and related diseases of protein crotonylation. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 3441-55

[5] Liu JF, Wu SF, Liu S, et al. Global lysine crotonylation profiling of mouse liver. *Proteomics*, 2020, 20: e2000049

[6] Li K, Wang Z. Histone crotonylation-centric gene regulation. *Epigenetics Chromatin*, 2021, 14: 10

[7] Wan J, Liu H, Chu J, et al. Functions and mechanisms of lysine crotonylation. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 7163-9

[8] Xu W, Wan J, Zhan J, et al. Global profiling of crotonylation on non-histone proteins. *Cell Res*, 2017, 27: 946-9

[9] Wu Q, Li W, Wang C, et al. Ultradeep lysine crotonylome reveals the crotonylation enhancement on both histones and nonhistone proteins by SAHA treatment. *J Proteome Res*, 2017, 16: 3664-71

[10] Ntorla A, Burgoyne JR. The regulation and function of histone crotonylation. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 624914

[11] Fang Y, Xu X, Ding J, et al. Histone crotonylation promotes mesoendodermal commitment of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 748-63.e7

[12] Biagosch C, Ediga RD, Hensler SV, et al. Elevated glutaric acid levels in Dhtkd1-/Gcdh- double knockout mice challenge our current understanding of lysine metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863: 2220-8

[13] Yu H, Bu C, Liu Y, et al. Global crotonylome reveals CDYL-regulated RPA1 crotonylation in homologous recombination-mediated DNA repair. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay4697

[14] Sabari BR, Zhang D, Allis CD, et al. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 90-101

[15] Wei W, Liu X, Chen J, et al. Class I histone deacetylases are major histone decrotonylases: evidence for critical and broad function of histone crotonylation in transcription. *Cell Res*, 2017, 27: 898-915

[16] Liu X, Wei W, Liu Y, et al. MOF as an evolutionarily conserved histone crotonyltransferase and transcriptional activation by histone acetyltransferase-deficient and crotonyltransferase-competent CBP/p300. *Cell Discov*, 2017, 3: 17016

[17] Li Y, Sabari BR, Panchenko T, et al. Molecular coupling of histone crotonylation and active transcription by AF9 YEATS domain. *Mol Cell*, 2016, 62: 181-93

[18] Sabari BR, Tang Z, Huang H, et al. Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol Cell*, 2015, 58: 203-15

[19] Kollenstart L, de Groot AJL, Janssen GMC, et al. Gcn5 and Esa1 function as histone crotonyltransferases to regulate crotonylation-dependent transcription. *J Biol Chem*, 2019, 294: 20122-34

- [20] Andrews FH, Shinsky SA, Shanle EK, et al. The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 396-8
- [21] Madsen AS, Olsen CA. Profiling of substrates for zinc-dependent lysine deacetylase enzymes: HDAC3 exhibits decrotonylase activity *in vitro*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 9083-7
- [22] Fellows R, Denizot J, Stellato C, et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun*, 2018, 9: 105
- [23] Kelly RDW, Chandru A, Watson PJ, et al. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 complexes regulate both histone acetylation and crotonylation *in vivo*. *Sci Rep*, 2018, 8: 14690
- [24] Feldman JL, Baeza J, Denu JM. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J Biol Chem*, 2013, 288: 31350-6
- [25] Bao X, Wang Y, Li X, et al. Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife*, 2014, 3: e02999
- [26] Zhao D, Guan H, Zhao S, et al. YEATS2 is a selective histone crotonylation reader. *Cell Res*, 2016, 26: 629-32
- [27] Xiong X, Panchenko T, Yang S, et al. Selective recognition of histone crotonylation by double PHD fingers of MOZ and DPF2. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 1111-8
- [28] Flynn EM, Huang OW, Poy F, et al. A subset of human bromodomains recognizes butyryllysine and crotonyllysine histone peptide modifications. *Structure*, 2015, 23: 1801-14
- [29] Liao P, Bhattarai N, Cao B, et al. Crotonylation at serine 46 impairs p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524: 730-5
- [30] Liu K, Yuan C, Li H, et al. A qualitative proteome-wide lysine crotonylation profiling of papaya (*Carica papaya* L.). *Sci Rep*, 2018, 8: 8230
- [31] Sun J, Qiu C, Qian W, et al. Ammonium triggered the response mechanism of lysine crotonylation in tea plants. *BMC Genomics*, 2019, 20: 340
- [32] Wei W, Mao A, Tang B, et al. Large-scale identification of protein crotonylation reveals its role in multiple cellular functions. *J Proteome Res*, 2017, 16: 1743-52
- [33] Yan G, Li X, Zheng Z, et al. KAT7-mediated CANX (calnexin) crotonylation regulates leucine-stimulated MTORC1 activity. *Autophagy*, 2022, 18: 2799-816
- [34] Bahl S, Ling H, Acharige NPN, et al. EGFR phosphorylates HDAC1 to regulate its expression and anti-apoptotic function. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 469
- [35] Abu-Zhayia ER, Machour FE, Ayoub N. HDAC-dependent decrease in histone crotonylation during DNA damage. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11: 804-6
- [36] Carusillo A, Mussolino C. DNA damage: from threat to treatment. *Cells*, 2020, 9: 1665
- [37] Toh M, Ngeow J. Homologous recombination deficiency: cancer predispositions and treatment implications. *Oncologist*, 2021, 26: e1526-37
- [38] He H, Wang J, Liu T. UV-induced RPA1 acetylation promotes nucleotide excision repair. *Cell Rep*, 2017, 20: 2010-25
- [39] Sun H, Liu X, Li F, et al. First comprehensive proteome analysis of lysine crotonylation in seedling leaves of *Nicotiana tabacum*. *Sci Rep*, 2017, 7: 3013
- [40] Holla S, Dhakshnamoorthy J, Folco HD, et al. Positioning heterochromatin at the nuclear periphery suppresses histone turnover to promote epigenetic inheritance. *Cell*, 2020, 180: 150-64.e15
- [41] Wang Z, Chen J, Gao C, et al. Epigenetic dysregulation induces translocation of histone H3 into cytoplasm. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: e2100779
- [42] Fernandez AJ, Berger JM. Mechanisms of hexameric helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56: 621-39
- [43] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017, 168: 960-76
- [44] Huang H, Wang DL, Zhao Y. Quantitative crotonylome analysis expands the roles of p300 in the regulation of lysine crotonylation pathway. *Proteomics*, 2018, 18: e1700230
- [45] Wan J, Liu H, Ming L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 976-82
- [46] Pant K, Peixoto E, Richard S, et al. Role of histone deacetylases in carcinogenesis: potential role in cholangiocarcinoma. *Cells*, 2020, 9: 780
- [47] He J, Wang S, Liu X, et al. Synthesis and biological evaluation of HDAC inhibitors with a novel zinc binding group. *Front Chem*, 2020, 8: 256
- [48] Wawruszak A, Borkiewicz L, Okon E, et al. Vorinostat (SAHA) and breast cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 4700
- [49] Li X, Li XM, Jiang Y, et al. Structure-guided development of YEATS domain inhibitors by targeting π - π - π stacking. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 1140-9
- [50] Wang M, Chang Q, Yang H, et al. Elevated lysine crotonylation and succinylation in the brains of BTBR mice. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 76: 61-4
- [51] Gateva G, Kremneva E, Reindl T, et al. Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations *in vitro*. *Curr Biol*, 2017, 27: 705-13
- [52] Kwon OK, Kim SJ, Lee S. First profiling of lysine crotonylation of myofilament proteins and ribosomal proteins in zebrafish embryos. *Sci Rep*, 2018, 8: 3652
- [53] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association. *Circulation*, 2020, 141: e139-596
- [54] Cai W, Xu D, Zeng C, et al. Modulating lysine crotonylation in cardiomyocytes improves myocardial outcomes. *Circ Res*, 2022, 131: 456-72
- [55] Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CWT, et al. A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 952-8
- [56] Zhang Y, Chen Y, Zhang Z, et al. Acox2 is a regulator of lysine crotonylation that mediates hepatic metabolic

- homeostasis in mice. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 279
- [57] Li D, Dewey MG, Wang L, et al. Crotonylation sensitizes IAPi-induced disruption of latent HIV by enhancing p100 cleavage into p52. *iScience*, 2022, 25: 103649
- [58] Bos J, Muir TW. A chemical probe for protein crotonylation. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 4757-60
- [59] Spinck M, Neumann-Staubitz P, Ecke M, et al. Evolved, selective erasers of distinct lysine acylations. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 11142-9
- [60] Xie Y, Yang L, Chen Q, et al. Single-step fluorescent probes to detect decrotonylation activity of HDACs through intramolecular reactions. *Eur J Med Chem*, 2021, 212: 113120
- [61] Ju Z, He JJ. Prediction of lysine crotonylation sites by incorporating the composition of k-spaced amino acid pairs into Chou's general PseAAC. *J Mol Graph Model*, 2017, 77: 200-4
- [62] Malebary SJ, Rehman MSU, Khan YD. iCrotoK-PseAAC: identify lysine crotonylation sites by blending position relative statistical features according to the Chou's 5-step rule. *PLoS One*, 2019, 14: e0223993
- [63] Lv H, Dao FY, Guan ZX, et al. Deep-Kcr: accurate detection of lysine crotonylation sites using deep learning method. *Brief Bioinform*, 2021, 22: bbaa255