半胱氨酸氧化还原修饰组分析: 进展与展望

杨靖*

军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心·北京, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

* 联系人, E-mail: yangjing@ncpsb.org.cn

收稿日期: 2020-11-26; 接受日期: 2021-02-26; 网络版发表日期: 2021-04-30

国家自然科学基金(批准号: 21922702, 31770885)和国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0501303)资助

摘要 半胱氨酸巯基上的氧化还原修饰能够可逆、可控地调节蛋白质活性、互作与定位, 进而实现对诸多生物学进程与信号通路的精细调控。在蛋白质组层面上分析此类修饰位点及其动态转换有助于系统描绘并解析氧化还原调控网络。近年来, 随着化学选择性标记试剂的不断涌现, 质谱技术的升级换代, 氧化还原修饰组分析的覆盖度与通量均得以极大提升, 为氧化还原生物学研究提供了有力的研究工具与丰富的数据资源。本文从技术发展的角度, 评述了目前常用的氧化还原蛋白质组技术类型及其优缺点、应用场景, 介绍了此类数据驱动的若干科学发现, 展望了未来拟突破与待拓展的方向。

关键词 氧化还原, 蛋白质组, 半胱氨酸, 质谱, 化学探针

氧化-还原是指化学反应前后, 元素的氧化态有变化的一类反应。在主要的生命构成元素当中, 硫(sulfur)具有多个氧化态(从-2到+6), 故其极易参与氧化还原反应。半胱氨酸(cysteine, Cys)是一种构成蛋白质组的含硫氨基酸。硫元素赋予了半胱氨酸化学上的“可变性”与功能上的“可调节性”。根据Uniprot知识库^[1], 半胱氨酸形成了多达22%的蛋白质活性位点, 尽管其在人类蛋白质组中分布的理论丰度仅为3.3%。在生物系统中, 氧化与还原是蛋白质半胱氨酸功能调节的主要途径, 其主要驱动力有两种。

其一是内源性代谢或外源性刺激产生的活性氧/氮/硫(reactive oxygen/nitrogen/sulfur species, ROS/RNS/RSS), 介导半胱氨酸上发生多种可逆修饰(或称氧化还原修饰)^[2-4]。限于篇幅, 本文仅讨论由非自由基型ROS(如过氧化氢, H_2O_2)介导的氧化反应(图1)。在该

氧化信号分子的直接作用下, 半胱氨酸残基侧链上的巯基(-SH)将首先被氧化为次磺酸(sulfenylation, -SOH), 后者既参与形成分子内或分子间二硫键-SS-或谷胱甘肽化修饰-SSG, 也能被进一步过氧化(peroxidation), 生成亚磺酸修饰(sulfinylation, -SO₂H)乃至磺酸修饰(sulfonation, -SO₃H)。

其二是细胞中复杂多样的还原酶系统, 介导上述修饰(除磺酸外)的还原(图1)。例如, 在大肠杆菌中, 次磺酸修饰能被两种异构酶DsbG/C特异性还原^[5]。二硫键和谷胱甘肽化修饰则能分别被进化保守的硫氧还蛋白/硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin/thioredoxin reductase, Trx/TrxR)和谷氧还蛋白/谷胱甘肽还原酶(glutaredoxin/glutathione reductase, Grx/GR)还原^[6]。此外, 生物系统中还存在一类ATP(adenosine triphosphate)依赖的亚磺酸还原酶(sulfiredoxin, Srx), 用于还原在化学上不

引用格式: 杨靖. 半胱氨酸氧化还原修饰组分析: 进展与展望. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1558-1570

Yang J. Mapping the cysteine redoxome: advances and prospects (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1558-1570, doi: 10.1360/SSV-2020-0393

图 1 半胱氨酸介导的蛋白质氧化还原转换
Figure 1 Cysteine-mediated redox transformation on proteins

可逆的亚磺酸修饰^[7]。

类似于其他重要翻译后修饰(如磷酸化、乙酰化、泛素化等),半胱氨酸氧化还原修饰能够可逆地调节蛋白质活性、互作与定位,进而实现对诸多生命活动的精细调控(表1)。在生理条件下,半胱氨酸氧化还原维持着动态平衡,而这些平衡失调则与许多重大疾病(如癌症^[19]、糖尿病^[20]、神经退行性疾病^[21]等)存在密切关联。为进一步系统研究半胱氨酸氧化还原修饰的生理、病理意义,有必要规模化测定其在关键生理活动或重大疾病发生、发展中的形成与变化。得益于快速发展的化学选择性标记技术以及日趋成熟的质谱分析方法,人们发展了种类繁多的氧化还原蛋白质组分析策略(redox proteomics)。鉴于近年来已有若干论文对这些策略进行全面综述^[22~26],本文拟从实用的角

度出发,讨论常用技术类型的选择及其驱动的科学发现,并展望该领域的未来研究方向。

1 半胱氨酸氧化还原修饰组分析: 技术与选择

无疑,“假设驱动”研究发现了一系列重要的氧化还原转换分子事件,并且揭示了它们在生理、病理背景下调控意义(表1)。蛋白质组学技术则以“数据驱动”模式,为人们提供观测半胱氨酸氧化还原转换的“广角镜”。在该类技术发展中,人们面临的首要难题即半胱氨酸氧化还原状态在化学上高度不稳定,在生物学上高度动态。因此,通常需采用化学策略来进行“捕获”与“富集”,最终利用质谱法进行定性、定量分析。本文主要介绍基于各类化学策略的氧化还原蛋白质组分析技术。

1.1 如何鉴定蛋白质组上氧化敏感的半胱氨酸残基位点?

确定复杂蛋白质组上氧化敏感的半胱氨酸残基位点无疑是研究氧化还原调控机制的第一步。一种最为经典的策略即采用亲电性化学试剂(如碘乙酰胺/碘乙酸及其衍生物,图2A)对亲核性的蛋白质巯基进行标记,通过免疫印迹或质谱定量,比较氧化剂处理前后标记效率的变化,间接地判断目标蛋白质是否发生氧化(图2B)。例如, Lee等人^[33]曾以放射性¹⁴C碘乙酸(¹⁴C

表 1 半胱氨酸氧化还原修饰介导的生物学功能调控
Table 1 Cysteine-mediated redox regulation of biological functions

蛋白质	修饰位点	修饰类型	调节方式	参与调控的生物学途径	参考文献
UCP1	Cys253	次磺酸化	活性	脂肪生热	[8]
IRE1	Cys663	次磺酸化	活性	ROS信号感知	[9]
PRDX2	Cys51	亚磺酸化	活性	昼夜节律	[10]
ATM	Cys2991	二硫键	互作	DNA损伤修复	[11]
FOXO	Cys239	二硫键	定位	氧化应激响应	[12]
CASP1	Cys397/Cys362	谷胱甘肽化	活性	内毒素休克	[13]
NPM1	Cys275	谷胱甘肽化	定位	核仁应激	[14]
SMYD2	Cys13	谷胱甘肽化	互作	肌原纤维稳定性	[15]
PKM2	Cys358	待定	活性	细胞代谢	[16]
LYN	Cys466	待定	活性	白细胞募集与损伤修复	[17]
Set1/MLL	多个	待定	活性	表观遗传与衰老	[18]

图 2 半胱氨酸氧化敏感性检测分析策略。A: 常用巯基反应性试剂化学结构。ICAT^[27]: 同位素亲和标签; IodoTMT^[28]: 半胱氨酸反应性串联质谱标签; IA^[29]: 炔基碘乙酰胺; IPM^[30]: 炔丙基碘乙酰胺; CPT^[31]: 带亚磷酸标签的半胱氨酸反应性试剂。B: 基于巯基反应性定量的蛋白质氧化检测。¹⁴C IA: ¹⁴C 碘乙酸。图改编自参考文献[32]

Figure 2 Chemical strategies for analyzing cysteine oxidation. A: Chemical structures of commonly used thiol-reactive reagents. ICAT^[27]: Isotope-coded affinity tag; IodoTMT^[28]: Iodoacetyl tandem mass tag; IA^[29]: Iodoacetamide alkyne; IPM^[30]: 2-iodo-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide; CPT^[31]: Cysteine-reactive phosphate tags. B: Detecting and profiling cysteine oxidation through loss of reactivity with thiol-reactive reagents. ¹⁴C IA: ¹⁴C iodoacetic acid. Adapted from Ref. [32]

iodoacetic acid, ¹⁴C IA)为巯基标记/检测试剂, 发现了半胱氨酸介导的酪氨酸磷酸酶PTP1B(tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1)氧化还原调控机制。如赋予此类巯基反应性试剂“富集与定量”的功能性, 便能在蛋白质组层面上, 系统地发现氧化敏感的半胱氨酸残基位点。例如, 人们利用商品化的功能化巯基标记试剂(包括基于亲和素富集、一级质谱定量的ICAT^[27]和基于抗体富集、二级质谱定量的IodoTMT^[28], 图2A), 发展了一系列氧化还原蛋白质组技术策略^[34-36]。然而, 这些试剂结构复杂, 空间位阻妨碍其与非表面半胱氨酸结合。此外, ICAT/IodoTMT标记蛋白/肽段的富集亦面临非特异性结合强、批间分析差异大等技术挑战。因此, 人们需要不断发展具有简化结构的功能化巯基标记试剂与更高效的富集方法。

随着生物正交概念的出现与“点击化学”的发展^[37], 巯基标记的“工具箱”不断丰富。近10年来, “可点击”巯基标记探针(如IA或IPM, 图2A)被广泛地用于分析小分子化合物(如H₂O₂或亲电性化合物)与巯基蛋白

质组的互作^[30,32,38-42]。探针标记的巯基蛋白质组或其酶切肽段可经“点击化学”反应转化为“可富集、可切割”的生物素化肽段, 富集后的修饰肽段能被酶切/光解等温和手段洗脱, 并进行基于质谱的定性与定量分析(详见参考文献^[32])。例如, 本课题组^[30,32]基于IPM探针, 发展了一种巯基反应性定量技术, 名为QTRP (quantitative thiol reactivity profiling), 仅在一次实验中即可定量测定数千蛋白质半胱氨酸残基的氧化敏感性。尽管这些定量化学蛋白质组技术在其开发者及其合作者实验室得到有效应用, 但其实验流程仍较为繁琐。因此, van de Reest等人^[43]发展了一种样品处理更为简单易行的氧化还原蛋白质组技术, 即采用稳定同位素标记的碘乙酰胺试剂, 无需富集, 直接利用深度覆盖策略定量分析整个蛋白质组。然而, 该策略需要大规模离线肽段分馏与较长的质谱采集时间(1~2天/样品), 限制了其分析通量。

通过上述策略, 人们能系统地筛选出氧化敏感的半胱氨酸位点, 然后研究氧化作用如何影响靶蛋白的

生化功能与生物学效应。反之, 人们亦可利用其他技术筛选出受氧化还原调控的蛋白质, 再用上述策略研究是否存在半胱氨酸依赖的分子机制。例如, Pei 等人^[44]利用转录因子组富集技术^[45], 发现 H_2O_2 能上调关键节律调节因子CLOCK的体外活性, 提示存在潜在氧化还原调控机制。随后, 他们利用QTRP技术准确地鉴定到CLOCK蛋白上的氧化敏感位点Cys195, 后续功能研究表明, 该位点突变能模拟敲低*clock*基因所造成的节律失调。

1.2 如何区分蛋白质半胱氨酸上的特定氧化还原修饰类型?

上述策略极大地拓展了各类物种蛋白质组上的氧化敏感半胱氨酸位点, 但其主要局限性在于无法区分氧化敏感位点上的具体修饰类型。不同类型氧化还原修饰可能对蛋白质功能产生相反影响。例如, 过氧化物酶PRDX2(peroxiredoxin 2)活性半胱氨酸残基被 H_2O_2 氧化为次磺酸后, 通过分子间二硫键的形式将氧化当量传递至下游转录因子STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)并抑制其转录活性, 而亚磺酸修饰则终止该氧化信号传递途径^[46]。又如, H_2O_2 可以通过次磺酸修饰激活许多受体型酪氨酸激酶(如表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)), 而其激酶活性却被亚磺酸修饰所抑制^[47,48]。因此, 精准区分修饰类型有助于阐明氧化还原作用对于蛋白质功能的具体影响。鉴于此, 人们发展了如下策略。

第一类为选择性还原策略(图3A), 即首先封闭蛋

白质组上所有还原型巯基, 然后采用化学/酶学体系选择性地可将可逆氧化型修饰还原为巯基, 最后采用功能化巯基反应性试剂(如ICAT, iodoTMT, 图2A)或固相载体(如树脂辅助捕获法(resin-assisted capture, RAC))进行富集、鉴定和定量^[50,53,54]。该策略成败的关键在于: (i) 还原型巯基能否被完全封闭? (ii) 是否存在高度专属的还原系统? 一方面, 常用烷基化试剂, 如碘乙酰胺, 即便是在高毫摩尔浓度下也难以实现100%的封闭效果, 导致假阳性^[55]。此外, 高浓度烷基化试剂也可能与氧化修饰发生反应, 导致假阴性^[56]。另一方面, 尽管选择性存疑, 但抗坏血酸/亚砷酸盐仍被用于还原次磺酸修饰^[57,58]。相比于化学还原, 酶学还原体系(如Grx/GR之于谷胱甘肽化修饰)无疑具有更高的专属性, 但后者的底物选择性却能造成分析的偏性。因此, 在此类策略的应用中, 设置对照组是避免上述问题的常用办法^[15,50]。

第二类为化学选择性标记策略(图3B), 即利用化学反应直接标记、富集并检测特定氧化修饰。早在20世纪70年代, Benitez和Allison^[59]即发现, 亲核性环己二酮试剂, 如DMD能选择性地与蛋白质次磺酸共价结合(基于其硫元素两性中的弱亲电性, 图4A)。在前者基础上, 人们发展了一系列次磺酸修饰检测试剂, 包括抗体^[60]、荧光素^[61]、生物素(DCP-Biotin)^[62]与“可点击”试剂(如DYN-2和DAz-2)^[63](图4B)。然而, 该基团与次磺酸反应的效率限制了相关试剂在蛋白质组分析中的应用^[64]。例如, 本课题组^[65,66]曾将DYN-2(图4B)用于次磺酸修饰位点的鉴定, 但在一次实验中需使用多达30~40 mg的蛋白样品, 极大地限制了该方法的应用场

图3 半胱氨酸特定类型氧化修饰检测分析策略。A: 选择性还原策略; B: 化学标记策略。图改编自参考文献^[32], 其中灰色圆形表示烷基化试剂, 用于封闭还原型巯基; 含E六角形表示功能性巯基反应性试剂或固相载体, 用于标记与富集(如ICAT^[27], iodoTMT^[49]和RAC^[50]); 含P六角形表示能选择性标记特定类型氧化修饰的化学探针(如BTD^[51]和DiaAlk^[52])

Figure 3 General strategies for analyzing distinct types of cysteine oxidation. A: Indirect strategy based on selective reducing reagents/enzymes; B: direct labeling and profiling specific cysteine oxoforms with chemoselective probes. Adapted from Ref. [32]. Grey circle represents thiol-alkylating reagent. Hexagon E represents functionalized thiol-reactive reagents/materials (e.g., ICAT^[27], iodoTMT^[49], and RAC^[50]). Hexagon P represents chemical probes (e.g., BTD^[51] and DiaAlk^[52]) specific to distinct types of cysteine oxidation

图4 蛋白质次磺酸修饰的化学选择性标记。A: 基于环己二酮的次磺酸标记反应^[59]; B: 基于环己二酮结构的次磺酸检测试剂, 包括抗体^[60]、荧光素^[61]、生物素^[62]以及“可点击”试剂^[63]; C: 基于苯并噻嗪探针BTD的次磺酸标记反应^[48]

Figure 4 Chemistry-based strategies for analyzing protein sulfenic acids. A: Dimedone is a chemoselective reagent for labeling protein sulfenic acid^[59]; B: dimedone-based reagents for detecting and profiling protein sulfenic acids, including antibody^[60], fluorescent-based^[61], biotin-based^[62], and “clickable” ones^[63]; C: chemoselective labeling of protein sulfenic acids with the “clickable” BTD probe^[48]

景。为此, 本课题组^[51]筛选了一系列环己二酮类似物, 发现苯并噻嗪与次磺酸的反应速率为前者的150倍以上。基于该基团设计的“可点击”次磺酸探针BTD(图4C)极大地提高了该修饰的分析能力^[67]。例如, 本课题组^[68,69]将其应用于拟南芥细胞和线虫中, 均鉴定了超过1000个次磺酸修饰位点。此外, 人们还针对次磺酸硫元素两性中的弱亲核性, 发展了一系列基于亲电性基团的探针, 然而均未能用于在位点水平上分析的次磺酸修饰组^[70-72]。相比于层出不穷的次磺酸探针, 针对其他氧化修饰类型的化学探针及其蛋白质组学应用则较少。例如, 近期本课题组^[52]针对亚磺酸硫元素的弱亲核性, 筛选出一类亲电性偶氮化合物, 后者能与亚磺酸形成稳定的磺胺键, 而与高度亲核性的巯基形成可还原的次磺酰胺键。利用两者稳定性的差异, 即可实现亚磺酸的选择性标记(图5A)。在此基础上发展出一种名为DiaAlk的探针(图5B), 使得选择性亚磺酸修饰组分析成为可能。

其他类型策略则相对“小众”, 包括以下三种。(i) 代谢标记策略, 仅限于谷胱甘肽化修饰的分析^[73-75], 即在细胞中加入带有功能化基团的人工合成谷胱甘肽或其前体, 利用自身代谢或谷胱甘肽合成系统在蛋白质组上引入功能化基团(如生物素或“可点击”官能团), 作为内源性谷胱甘肽修饰的“替代”。通过富集和分析代谢标记探针修饰肽段, 即可鉴定谷胱甘肽化修饰蛋白及其位点。(ii) 遗传探针策略, 仅限于次磺酸修饰的分析^[76], 即通过遗传操作在细胞中表达突变型YAP1 (Yes-associated protein 1)蛋白, 后者唯一的Cys598能通

图5 蛋白质亚磺酸修饰的化学选择性标记。A: 亲电性氮类化合物与亚磺酸、巯基的结合反应及其产物稳定性差异; B: 基于亲电性偶氮探针DiaAlk的亚磺酸标记反应^[52]

Figure 5 Chemistry-based strategies for analyzing protein sulfenic acids A: Electrophilic nitrogen species react with protein thiols and sulfenic acids to yield reducible sulfenamide products and stable sulfonamide products, respectively; B: chemoselective labeling of protein sulfenic acids with the “clickable” DiaAlk probe^[52]

过二硫键形式“捕获”并鉴定次磺酸化蛋白质组。有趣的是, Wei等人^[77]最近利用含有YAP1 Cys598的七肽, 制备了用于富集二硫键交联肽段的抗体, 实现了位点水平上的鉴定。(iii) 离子交换分离策略, 仅限于(亚)磺酸修饰的分析^[78], 即利用(亚)磺酸修饰肽段与正常肽段在酸性条件下解离能力的差异, 实现前者的相对富集。

1.3 如何测定氧化比例?

有一种普遍观点认为, 翻译后修饰的比例与其功能性呈正相关, 即只有当修饰比例较高时才能发挥对蛋白质功能的调控作用^[79]。为此, 人们发展了多种定

量蛋白质组技术, 用于规模化地测定各种修饰的比例(如磷酸化^[80]、乙酰化^[81]、氧化^[82])。其中, Jakob课题组^[82]最先报道了一种基于ICAT的绝对氧化比例测定方法, 名为OxICAT(图6)。该方法利用带有稳定同位素标签的ICAT试剂, 分别对还原剂处理前后的同一样品进行标记, 富集后采用质谱定性、定量。该方法不仅得到广泛应用^[82~85], 而且在此基础上衍生出诸多变体^[31,86~90]。例如, Xiao等人^[31]最近发展了一种基于亚磷酸基团的功能化巯基标记试剂CPT(图2A), 结合二级质谱定量技术, 系统分析了小鼠各主要器官蛋白质组的氧化修饰比例, 构建了名为Oximouse的数据资源。该研究表明, 与其他修饰类似, 氧化比例同样偏低, 平均水平小于20%。尽管氧化比例偏高(>20%)的位点能被富集于特定生物学通路或网络, 但这并未否定比例偏低者的生物学意义。有趣的是, Su等人^[54]发现, 激酶Akt上Cys60的基础氧化比例仅为0.5%, 在温和氧化应激条件下上调至1.25%, 但仍然能对该蛋白质功能及其介导的生物学效应产生显著影响。绝大多数还原型半胱氨酸的作用可能更像是“缓冲区”或“蓄水池”, 以防发生真正意义上的氧化损伤。因此, 对于生理条件下的氧化还原调节而言, 本文认为, 巯基反应性或氧

化还原修饰水平的相对变化更能反映其所蕴含的功能性。尽管如此, 组学层面上绝对修饰比例的测定仍能为人们认识氧化修饰的序列/结构选择性提供重要线索(见下文)。此外, 鉴于临床上使用的共价抑制剂多用于靶向蛋白质的半胱氨酸(如表皮生长因子受体EGFR的Cys797、Bruton酪氨酸蛋白激酶BTK的Cys481), 氧化比例数据对于判定药物敏感性或预测耐药亦有重要参考价值^[91]。

2 氧化还原修饰组分析驱动的科学发现

如上所述, 氧化还原蛋白质组分析技术、方法不断地发展、迭代、升级, 为“氧化还原生物学”领域提供了丰富的研究工具与数据资源。更重要的是, 以蛋白质组为尺度观测生物体氧化还原调控网络, 有望得到难以“假设”的科学发现。本节将以本课题组研究为主, 结合该领域近年来其他代表性工作, 介绍此类技术分析能从哪些角度推动人们对半胱氨酸介导氧化还原调控的认识。

2.1 揭示氧化位点的选择性与序列/结构特征

人们过去常认为氧化修饰仅仅是一种“无序”或“随机”的非调控行为。然而, 近10年来, 越来越多的氧化还原蛋白质组数据显示氧化作用存在位点特异性。例如, 通过分析超过1000个次磷酸修饰位点所在的一级序列, 本课题组^[65]发现, 该修饰倾向于发生在蛋白质表面的半胱氨酸残基, 且存在若干特异性基序(如CxxE, CxxxE和KxC)。基于该组数据, 生物信息学家们发展了许多次磷酸修饰的预测算法^[92~96]。又如, Xiao等人^[31]结合Oximouse与蛋白质结构数据, 揭示半胱氨酸与精氨酸的空间配对作用与前者的氧化程度相关。

2.2 筛选功能性氧化还原修饰位点

参与酶催化的活性半胱氨酸位点大多具有较高的反应性和亲核性, 故在“假设驱动”研究中成为氧化还原转换的预测靶标。氧化还原蛋白质组分析能全面证实这些发现, 并将个别蛋白质的氧化敏感性拓展至整个酶家族。例如, 在Lee等人^[33]发现首个氧化敏感的酪氨酸磷酸酶PTP1B十多年后, Karisch等人^[97]利用氧化还原蛋白质组技术系统分析了氧化对该酶家族的整体功能影响。又比如, 同时期多项“假设驱动”研究与次磷

图 6 OxICAT技术流程图。(1)采用重标(氘代)ICAT结合蛋白质组上还原型巯基;(2)还原可逆氧化型半胱氨酸;(3)采用轻标ICAT结合新生成的还原型巯基;(4)酶切;(5)链霉亲和素富集;(6)色谱质谱联用定性、定量。注: d0-ICAT和d8-ICAT分别为带有轻重同位素标签的ICAT试剂, 质量差为8 Da; %Oxi为氧化比例

Figure 6 Schematic workflow of OxICAT. (1) Labeling of free proteomic thiols with the heavy ICAT reagent (blue); (2) reduction of reversibly oxidized cysteines in the same sample; (3) labeling of newly reduced cysteines with the light ICAT reagent (red); (4) digesting the isotopically labeled protein sample into peptides; (5) streptavidin enrichment of biotinylated peptides; (6) identification and quantification of isotopically labeled peptides using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS). d0-ICAT and d8-ICAT: light and heavy isotopically labeled ICAT reagents, respectively, with a mass shift of 8 Da. %Oxi: Percent oxidation

酸修饰组分析均发现去泛素化酶家族的氧化敏感性^[65,98-100]。

对于酶蛋白上非催化位点, 或非酶蛋白, 其上半胱氨酸位点的氧化敏感性与功能性通常不易预测。氧化还原修饰组分析则能为此类位点的氧化还原功能研究提供数据支持或预测线索。例如, 通过分析拟南芥活细胞的次磺酸修饰组, 本课题组^[68]在蛋白激酶MAPK4的非催化Cys181上鉴定到该修饰, 结合进化保守性与生化分析, 发现其对该酶存在别构调节作用。又如, 本课题组^[69]系统分析了线虫蛋白质组上半胱氨酸的三种主要氧化还原形态(-SH, -SOH和-SO₂H), 及其在外源性H₂O₂信号刺激下的变化, 发现p38-MAPK通路中所有蛋白上均存在氧化敏感位点, 其中两个非催化位点对于该通路激活至关重要。

2.3 拓展还原酶系统的底物谱

氧化还原修饰在去修饰酶(即还原酶)的作用下实现功能重塑, 故还原酶能通过其底物调控广泛的生物学过程。尽管人们早已阐明了主要还原酶系统(如Trx/TrxR, Grx/GR和Srx, 图1)的催化机制, 但对于它们的底物仍知之甚少。通过遗传手段(敲除或过表达)改变这些还原酶的表达水平后, 它们底物位点的氧化还原水平必然发生变化。因此, 定量分析这些变化即可筛选出还原酶的潜在底物。例如, 对于亚磺酸还原酶Srx, 过去认为其专属底物仅有过氧化物酶Prx1-4(peroxiredoxin 1-4)^[101]。为此, 本课题组^[52]定量分析了亚磺酸修饰组对于该酶的依赖性, 发现了55个新底物, 并对其中部分底物进行了验证。此外, 还原酶功能性底物的发现也能加深人们对其生物学调控机制的认识。例如, 硫氧化还原蛋白在果蝇胚胎发育过程中至关重要, 敲除表达该蛋白的基因后, 无法形成正常头部, 故命名为“Deadhead (DHD)”^[102]。然而, 其究竟通过哪个底物调控胚胎发育? 通过定量分析果蝇胚胎中还原型半胱氨酸组对于Deadhead的依赖性, 本课题组^[103]鉴定了后者多个潜在底物, 包括细胞核氧化酶NO66。后者与DHD在生化和遗传学层面上均存在互作, 提示其是DHD调控胚胎发育的功能性底物^[103]。

3 总结与展望

半胱氨酸氧化还原修饰组分析为“氧化还原生物

学”研究提供了重要的修饰位点与动态转换信息, 拓展了人们对氧化还原作用选择性与调控范畴的认识。本文介绍了一些代表性技术或分析策略。尽管它们各有长短, 却无绝对意义上的优劣之分。感兴趣的读者需根据研究对象(裂解液、活细胞、组织)、应用场景(研究氧化转换的分子基础, 或筛选生理、病理背景下的调控位点/酶底物)、工作条件(试剂与仪器可及性)等进行选择。无论采取哪种技术策略, 都应注意避免在蛋白提取过程中造成的“非生理氧化”, 主要手段包括酸沉淀、脱气、低温、引入抗氧化剂/酶等。对于操作复杂的组织样本, 如有条件, 建议在无氧实验台中进行蛋白提取操作。此外, 对照组的设置以及定量质谱分析的引入也有助于校正“非生理氧化”带来的误差。

面向未来, 氧化还原蛋白质组技术的开发仍需紧密围绕应用需求而展开。例如, 多数氧化还原蛋白质组技术目前所需起始蛋白量仍为毫克级, 而这在发育、免疫、神经生物学等领域的研究中往往不具备可操作性。因此亟需开发更为高效的探针与富集技术、以及更灵敏的质谱检测方法。又比如, 氧化信号具有高度的时空特异性, 而目前技术缺乏时空分辨力, 难以真正阐明半胱氨酸介导氧化还原信号转导机制。因此亟需开发能靶向(亚)细胞器化学探针, 以及具有“时空分辨率”的氧化还原蛋白质组技术方法^[104]。

在技术应用层面上, 当前研究多数集中在分析外源性刺激对氧化还原修饰组的作用, 难以直接建立氧化还原调节与生理活动、病理进展之间的逻辑联系。因此, 一方面, 有必要系统描绘内源性氧化信号与还原系统共同介导的氧化还原调控网络, 并阐明其生理意义。另一方面, 有必要将氧化还原蛋白质组技术应用于发现疾病相关因素决定的氧化还原调控事件, 并挖掘后者作为治疗靶标的潜力。例如, Chio等人^[35]和Bar-Peled等人^[40]分别分析了转录因子NRF2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)缺失对于胰腺癌和非小细胞肺癌细胞疏基蛋白质组的影响, 揭示了NRF2介导的半胱氨酸氧化还原转换对于mRNA翻译机器与糖酵解通路的调控作用, 并且提出了靶向氧化还原稳态的治疗策略。

上述讨论主要面向半胱氨酸的氧化还原修饰组分析。然而, 氧化还原作用之于蛋白质组并不限于半胱氨酸。另一种含硫氨基酸——甲硫氨酸(methionine, Met)

上的氧化还原转换同样值得关注, 尤其是考虑到这类分子事件对于蛋白质结构与相分离状态的影响^[105,106]. 值得一提的是, Lin 等人^[107]发展了一种用于选择性标记该氨基酸的化学探针, 结合蛋白质组技术, 首次实现了甲硫氨酸组的分析. 尽管如此, 针对甲硫氨酸的氧化还原蛋白质组分析仍然方兴未艾. 此外, 诸多体外实验表明, 自由基型 ROS 能直接诱导多型氨基酸残基

侧链或肽链骨架断裂^[108,109]. 在生理条件下, 自由基型 ROS 是否或如何修饰或破坏蛋白质组仍有待进一步研究^[110].

综上所述, 随着新一代化学/遗传探针的出现、样品富集方法的完善、质谱技术的革新, 氧化还原修饰组分析的方法学与应用必将不断发展, 进而成为“氧化还原生物学”研究的强力“引擎”.

致谢 本文根据作者在香山科学会议第 654 次学术讨论会上所作报告整理, 感谢与会专家提出的宝贵意见与建议.

参考文献

- 1 Uniprot C. Uniprot: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D506–D515
- 2 Paulsen C E, Carroll K S. Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*, 2013, 113: 4633–4679
- 3 Stamler J S, Lamas S, Fang F C. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 2001, 106: 675–683
- 4 Filipovic M R, Zivanovic J, Alvarez B, et al. Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation. *Chem Rev*, 2018, 118: 1253–1337
- 5 Depuydt M, Leonard S E, Vertommen D, et al. A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, 2009, 326: 1109–1111
- 6 Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 237–271
- 7 Biteau B, Labarre J, Toledano M B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 2003, 425: 980–984
- 8 Chouchani E T, Kazak L, Jedrychowski M P, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. *Nature*, 2016, 532: 112–116
- 9 Hourihan J M, Moronetti Mazzeo L E, Fernández-Cárdenas L P, et al. Cysteine sulfenylation directs IRE-1 to activate the SKN-1/Nrf2 antioxidant response. *Mol Cell*, 2016, 63: 553–566
- 10 O'Neill J S, Reddy A B. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, 2011, 469: 498–503
- 11 Guo Z, Kozlov S, Lavin M F, et al. ATM activation by oxidative stress. *Science*, 2010, 330: 517–521
- 12 Putker M, Madl T, Vos H R, et al. Redox-dependent control of FOXO/DAF-16 by transportin-1. *Mol Cell*, 2013, 49: 730–742
- 13 Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol*, 2008, 9: 866–872
- 14 Yang K, Wang M, Zhao Y, et al. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nat Commun*, 2016, 7: 13599
- 15 Munkanatta Godage D N P, VanHecke G C, Samarasinghe K T G, et al. SMYD2 glutathionylation contributes to degradation of sarcomeric proteins. *Nat Commun*, 2018, 9: 4341
- 16 Anastasiou D, Poulgiannis G, Asara J M, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*, 2011, 334: 1278–1283
- 17 Yoo S K, Starnes T W, Deng Q, et al. LYN is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction *in vivo*. *Nature*, 2011, 480: 109–112
- 18 Bazopoulou D, Knoefler D, Zheng Y, et al. Developmental ROS individualizes organismal stress resistance and lifespan. *Nature*, 2019, 576: 301–305
- 19 Chio I I C, Tuveson D A. ROS in cancer: The burning question. *Trends Mol Med*, 2017, 23: 411–429
- 20 Goldstein B J, Mahadev K, Kalyankar M, et al. Redox paradox: Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes*, 2005, 54: 311–321
- 21 McBean G J, Aslan M, Griffiths H R, et al. Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease. *Redox Biol*, 2015, 5: 186–194
- 22 Yang J, Carroll K S, Liebler D C. The expanding landscape of the thiol redox proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2016, 15: 1–11
- 23 Alcock L J, Perkins M V, Chalker J M. Chemical methods for mapping cysteine oxidation. *Chem Soc Rev*, 2018, 47: 231–268

- 24 Yu J, Li Y, Qin Z, et al. Plant chloroplast stress response: Insights from thiol redox proteomics. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33: 35–57
- 25 Duan J, Gaffrey M J, Qian W J. Quantitative proteomic characterization of redox-dependent post-translational modifications on protein cysteines. *Mol Biosyst*, 2017, 13: 816–829
- 26 Wojdyla K, Rogowska-Wrzęsinska A. Differential alkylation-based redox proteomics—Lessons learnt. *Redox Biol*, 2015, 6: 240–252
- 27 Gygi S P, Rist B, Gerber S A, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 994–999
- 28 Pan K T, Chen Y Y, Pu T H, et al. Mass spectrometry-based quantitative proteomics for dissecting multiplexed redox cysteine modifications in nitric oxide-protected cardiomyocyte under hypoxia. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 1365–1381
- 29 Weerapana E, Wang C, Simon G M, et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, 2010, 468: 790–795
- 30 Fu L, Liu K, Sun M, et al. Systematic and quantitative assessment of hydrogen peroxide reactivity with cysteines across human proteomes. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16: 1815–1828
- 31 Xiao H, Jedrychowski M P, Schweppe D K, et al. A quantitative tissue-specific landscape of protein redox regulation during aging. *Cell*, 2020, 180: 968–983.e24
- 32 Fu L, Li Z, Liu K, et al. A quantitative thiol reactivity profiling platform to analyze redox and electrophile reactive cysteine proteomes. *Nat Protoc*, 2020, 15: 2891–2919
- 33 Lee S R, Kwon K S, Kim S R, et al. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 1998, 273: 15366–15372
- 34 Kumar V, Kleffmann T, Hampton M B, et al. Redox proteomics of thiol proteins in mouse heart during ischemia/reperfusion using icat reagents and mass spectrometry. *Free Radic Biol Med*, 2013, 58: 109–117
- 35 Chio I I C, Jafarnejad S M, Ponz-Sarvisé M, et al. Nrf2 promotes tumor maintenance by modulating mRNA translation in pancreatic cancer. *Cell*, 2016, 166: 963–976
- 36 Vajrychova M, Salovska B, Pimkova K, et al. Quantification of cellular protein and redox imbalance using silac-iodotmt methodology. *Redox Biol*, 2019, 24: 101227
- 37 Parker C G, Pratt M R. Click chemistry in proteomic investigations. *Cell*, 2020, 180: 605–632
- 38 Deng X, Weerapana E, Ulanovskaya O, et al. Proteome-wide quantification and characterization of oxidation-sensitive cysteines in pathogenic bacteria. *Cell Host Microbe*, 2013, 13: 358–370
- 39 Vinogradova E V, Zhang X, Remillard D, et al. An activity-guided map of electrophile-cysteine interactions in primary human T cells. *Cell*, 2020, 182: 1009–1026.e29
- 40 Bar-Peled L, Kemper E K, Suci R M, et al. Chemical proteomics identifies druggable vulnerabilities in a genetically defined cancer. *Cell*, 2017, 171: 696–709.e23
- 41 Wang W, Yang J, Zhang J, et al. An *Arabidopsis* secondary metabolite directly targets expression of the bacterial type III secretion system to inhibit bacterial virulence. *Cell Host Microbe*, 2020, 27: 601–613.e7
- 42 Backus K M, Correia B E, Lum K M, et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature*, 2016, 534: 570–574
- 43 van der Reest J, Lilla S, Zheng L, et al. Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nat Commun*, 2018, 9: 1581
- 44 Pei J F, Li X K, Li W Q, et al. Diurnal oscillations of endogenous H₂O₂ sustained by p66Shc regulate circadian clocks. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1553–1564
- 45 Ding C, Chan D W, Liu W, et al. Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 6771–6776
- 46 Sobotta M C, Liou W, Stöcker S, et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 64–70
- 47 Truong T H, Ung P M U, Palde P B, et al. Molecular basis for redox activation of epidermal growth factor receptor kinase. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 837–848
- 48 Heppner D E, Dustin C M, Liao C, et al. Direct cysteine sulfenylation drives activation of the Src kinase. *Nat Commun*, 2018, 9: 4522
- 49 Parker J, Zhu N, Zhu M, et al. Profiling thiol redox proteome using isotope tagging mass spectrometry. *J Vis Exp*, 2012, doi: 10.3791/3766
- 50 Guo J, Gaffrey M J, Su D, et al. Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible

- modifications. *Nat Protoc*, 2014, 9: 64–75
- 51 Gupta V, Yang J, Liebler D C, et al. Diverse redoxome reactivity profiles of carbon nucleophiles. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 5588–5595
- 52 Akter S, Fu L, Jung Y, et al. Chemical proteomics reveals new targets of cysteine sulfinic acid reductase. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 995–1004
- 53 García-Santamarina S, Boronat S, Domènech A, et al. Monitoring *in vivo* reversible cysteine oxidation in proteins using icat and mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2014, 9: 1131–1145
- 54 Su Z, Burchfield J G, Yang P, et al. Global redox proteome and phosphoproteome analysis reveals redox switch in Akt. *Nat Commun*, 2019, 10: 5486
- 55 Chi H, Liu C, Yang H, et al. Comprehensive identification of peptides in tandem mass spectra using an efficient open search engine. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 1059–1061
- 56 Reisz J A, Bechtold E, King S B, et al. Thiol-blocking electrophiles interfere with labeling and detection of protein sulfenic acids. *FEBS J*, 2013, 280: 6150–6161
- 57 Anschau V, Ferrer-Sueta G, Aleixo-Silva R L, et al. Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. *Free Radic Biol Med*, 2020, 156: 207–216
- 58 Tyther R, Ahmeda A, Johns E, et al. Proteomic profiling of perturbed protein sulfenation in renal medulla of the spontaneously hypertensive rat. *J Proteome Res*, 2010, 9: 2678–2687
- 59 Benitez L V, Allison W S. The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. *J Biol Chem*, 1974, 249: 6234–6243
- 60 Seo Y H, Carroll K S. Profiling protein thiol oxidation in tumor cells using sulfenic acid-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 16163–16168
- 61 Poole L B, Zeng B B, Knaggs S A, et al. Synthesis of chemical probes to map sulfenic acid modifications on proteins. *Bioconjug Chem*, 2005, 16: 1624–1628
- 62 Poole L B, Klomsiri C, Knaggs S A, et al. Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 2004–2017
- 63 Paulsen C E, Truong T H, Garcia F J, et al. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat Chem Biol*, 2011, 8: 57–64
- 64 Gupta V, Carroll K S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 847–875
- 65 Yang J, Gupta V, Carroll K S, et al. Site-specific mapping and quantification of protein *S*-sulphenylation in cells. *Nat Commun*, 2014, 5: 4776
- 66 Yang J, Gupta V, Tallman K A, et al. Global, *in situ*, site-specific analysis of protein *S*-sulphenylation. *Nat Protoc*, 2015, 10: 1022–1037
- 67 Fu L, Liu K, Ferreira R B, et al. Proteome-wide analysis of cysteine *S*-sulphenylation using a benzothiazine-based probe. *Curr Protoc Protein Sci*, 2019, 95: e76
- 68 Huang J, Willems P, Wei B, et al. Mining for protein *S*-sulphenylation in *Arabidopsis* uncovers redox-sensitive sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 21256–21261
- 69 Meng J, Fu L, Liu K, et al. Global profiling of distinct cysteine redox forms reveals wide-ranging redox regulation in *C. elegans*. *Nat Commun*, 2021 12: 1415
- 70 Poole T H, Reisz J A, Zhao W, et al. Strained cycloalkynes as new protein sulfenic acid traps. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 6167–6170
- 71 Alcock L J, Langini M, Stühler K, et al. Proteome-wide survey of cysteine oxidation by using a norbornene probe. *ChemBiochem*, 2020, 21: 1329–1334
- 72 Alcock L J, Oliveira B L, Deery M J, et al. Norbornene probes for the detection of cysteine sulfenic acid in cells. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 594–598
- 73 VanHecke G C, Yapa Abeywardana M, Huang B, et al. Isotopically labeled clickable glutathione to quantify protein *S*-glutathionylation. *ChemBiochem*, 2020, 21: 853–859
- 74 Feng S, Zhang L, Adilijiang G, et al. Substrate profiling of glutathione *S*-transferase with engineered enzymes and matched glutathione analogues. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 7149–7153
- 75 Feng S, Chen Y, Yang F, et al. Development of a clickable probe for profiling of protein glutathionylation in the central cellular metabolism of *E. coli* and *Drosophila*. *Chem Biol*, 2015, 22: 1461–1469
- 76 Waszczak C, Akter S, Eeckhout D, et al. Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 11545–11550

- 77 Wei B, Willems P, Huang J, et al. Identification of sulfenylated cysteines in *Arabidopsis thaliana* proteins using a disulfide-linked peptide reporter. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 777
- 78 Paulech J, Liddy K A, Engholm-Keller K, et al. Global analysis of myocardial peptides containing cysteines with irreversible sulfinic and sulfonic acid post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14: 609–620
- 79 Prus G, Hoegl A, Weinert B T, et al. Analysis and interpretation of protein post-translational modification site stoichiometry. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44: 943–960
- 80 Wu R, Haas W, Dephoure N, et al. A large-scale method to measure absolute protein phosphorylation stoichiometries. *Nat Methods*, 2011, 8: 677–683
- 81 Weinert B T, Iesmantavicius V, Moustafa T, et al. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Syst Biol*, 2014, 10: 716
- 82 Leichert L I, Gehrke F, Gudiseva H V, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 8197–8202.
- 83 Knoefler D, Thamsen M, Konieczek M, et al. Quantitative *in vivo* redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life. *Mol Cell*, 2012, 47: 767–776
- 84 Rosenwasser S, Graff van Creveld S, Schatz D, et al. Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 2740–2745
- 85 Brandes N, Reichmann D, Tienson H, et al. Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *J Biol Chem*, 2011, 286: 41893–41903
- 86 Topf U, Suppanz I, Samluk L, et al. Quantitative proteomics identifies redox switches for global translation modulation by mitochondrially produced reactive oxygen species. *Nat Commun*, 2018, 9: 324
- 87 Duan J, Zhang T, Gaffrey M J, et al. Stoichiometric quantification of the thiol redox proteome of macrophages reveals subcellular compartmentalization and susceptibility to oxidative perturbations. *Redox Biol*, 2020, 36: 101649
- 88 Kramer P A, Duan J, Gaffrey M J, et al. Fatiguing contractions increase protein S-glutathionylation occupancy in mouse skeletal muscle. *Redox Biol*, 2018, 17: 367–376
- 89 Wang J, Zhang T, Johnston C J, et al. Protein thiol oxidation in the rat lung following e-cigarette exposure. *Redox Biol*, 2020, 37: 101758
- 90 Parker J, Balmant K, Zhu F, et al. cystMTTRAQ—An integrative method for unbiased thiol-based redox proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14: 237–242
- 91 Schwartz P A, Kuzmic P, Solowiej J, et al. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 173–178
- 92 Xu Y, Ding J, Wu L Y. Isulf-cys: Prediction of S-sulfenylation sites in proteins with physicochemical properties of amino acids. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154237
- 93 Wang L, Zhang R, Mu Y. Fu-SulfPred: identification of protein S-sulfenylation sites by fusing forests via Chou's general PseAAC. *J Theor Biol*, 2019, 461: 51–58
- 94 Bui V M, Weng S L, Lu C T, et al. Sohsite: Incorporating evolutionary information and physicochemical properties to identify protein S-sulfenylation sites. *BMC Genomics*, 2016, 17: 9
- 95 Jia C, Zuo Y. S-sulfpred: A sensitive predictor to capture S-sulfenylation sites based on a resampling one-sided selection undersampling-synthetic minority oversampling technique. *J Theor Biol*, 2017, 422: 84–89
- 96 Wang X, Yan R, Li J, et al. Sohpred: A new bioinformatics tool for the characterization and prediction of human S-sulfenylation sites. *Mol Biosyst*, 2016, 12: 2849–2858
- 97 Karisch R, Fernandez M, Taylor P, et al. Global proteomic assessment of the classical protein-tyrosine phosphatome and “redoxome”. *Cell*, 2011, 146: 826–840
- 98 Cotto-Rios X M, Békés M, Chapman J, et al. Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. *Cell Rep*, 2012, 2: 1475–1484
- 99 Lee J G, Baek K, Soetandyo N, et al. Reversible inactivation of deubiquitinases by reactive oxygen species *in vitro* and in cells. *Nat Commun*, 2013, 4: 1568
- 100 Kulathu Y, Garcia F J, Mevissen T E T, et al. Regulation of A20 and other OTU deubiquitinases by reversible oxidation. *Nat Commun*, 2013, 4: 1569

- 101 Woo H A, Jeong W, Chang T S, et al. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. *J Biol Chem*, 2005, 280: 3125–3128
- 102 Salz H K, Flickinger T W, Mittendorf E, et al. The drosophila maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development. *Genetics*, 1994, 136: 1075–1086
- 103 Petrova B, Liu K, Tian C, et al. Dynamic redox balance directs the oocyte-to-embryo transition via developmentally controlled reactive cysteine changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E7978–E7986
- 104 Bak D W, Bechtel T J, Falco J A, et al. Cysteine reactivity across the subcellular universe. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 48: 96–105
- 105 Yang Y S, Kato M, Wu X, et al. Yeast ataxin-2 forms an intracellular condensate required for the inhibition of TORC1 signaling during respiratory growth. *Cell*, 2019, 177: 697–710.e17
- 106 Kato M, Yang Y S, Sutter B M, et al. Redox state controls phase separation of the yeast ataxin-2 protein via reversible oxidation of its methionine-rich low-complexity domain. *Cell*, 2019, 177: 711–721.e8
- 107 Lin S, Yang X, Jia S, et al. Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation. *Science*, 2017, 355: 597–602
- 108 Fedorova M, Bollineni R C, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spec Rev*, 2014, 33: 79–97
- 109 Garrison W M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev*, 1987, 87: 381–398
- 110 Tian C, Liu K, Sun R, et al. Chemoproteomics reveals unexpected lysine/arginine-specific cleavage of peptide chains as a potential protein degradation machinery. *Anal Chem*, 2018, 90: 794–800

Mapping the cysteine redoxome: advances and prospects

YANG Jing

State Key Laboratory of Proteomics, National Center for Protein Sciences • Beijing, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 102206, China

Redox changes on cysteine residues can reversibly alter protein functions, such as activity, interaction and localization, representing a crucial and sophisticated mechanism in cellular regulation and signaling. Site-specific and quantitative profiling of cysteine redox forms on a proteome-wide scale greatly expands the scope and role for redox regulation in biological systems. Taking advantage of recent advances in the development of chemoselective reagents/probes and rapid evolution of mass spectrometers, the depth and throughput of redox proteomic technologies have been greatly improved, affording a powerful toolbox and many great data resources for studying redox biology. From the perspective of methodological development, this review is mainly focused on the major types of redox proteomic strategies commonly used in the last decade. In particular, their pros and cons are discussed, so as the application scenarios by highlighting several examples in which the discoveries of new redox mechanisms are driven by such analyses. My prospects are also proposed on technological innovation for redox proteomics and future directions in this rapid growing field.

redox, proteomics, cysteine, mass spectrometry, chemical probe

doi: [10.1360/SSV-2020-0393](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0393)

杨靖, 军事医学研究院生命组学研究所研究员. 主要从事氧化还原蛋白质组学研究, 发展了一系列“可点击”化学探针与定量化学蛋白质组技术, 实现了氧化还原修饰的全面定位及其动态转换的精准测量. 近5年来, 以通讯作者(含共同)身份在*Nature Chemical Biology*, *Nature Communications*, *Nature Protocols*, *Proc Natl Acad Sci USA*等高水平学术期刊上发表多篇研究论文或评述论文. 多次受邀作为报告人参加国内外著名学术会议, 如香山科学会议, Gordon Research Conferences, EMBO Workshop, Keystone Symposia, Human Proteome Organization World Congress等.