

蛋白质翻译后修饰研究进展

胡 笏 郭燕婷 李艳梅*

(清华大学化学系, 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084. * 联系人, E-mail: liy@mail.tsinghua.edu.cn)

摘要 蛋白质翻译后修饰在生命体中具有十分重要的作用. 它使蛋白质的结构更为复杂, 功能更为完善, 调节更为精细, 作用更为专一. 常见的蛋白质翻译后修饰过程有泛素化、磷酸化、糖基化、脂基化、甲基化和乙酰化等. 泛素化对于细胞分化与凋亡、DNA 修复、免疫应答和应激反应等生理过程起着重要作用; 磷酸化涉及细胞信号转导、神经活动、肌肉收缩以及细胞的增殖、发育和分化等生理病理过程; 糖基化在许多生物过程中如免疫保护、病毒的复制、细胞生长、炎症的产生等起着重要的作用; 脂基化对于生物体内的信号转导过程起着非常关键的作用; 组蛋白上的甲基化和乙酰化与转录调节有关. 在体内, 各种翻译后修饰过程不是孤立存在的. 本文对上述几种类型的蛋白质翻译后修饰的研究近况进行了综述, 讨论了各种翻译后修饰形式相互影响、相互协调的关系.

关键词 蛋白质翻译后修饰 泛素化 磷酸化 糖基化 脂基化 甲基化 乙酰化

以色列科学家 A. Ciechanover, A. Hershko 和美国科学家 O. Rose 由于揭示了泛素调节的蛋白质降解机理, 指明了蛋白质降解研究的方向, 获得 2004 年诺贝尔化学奖. 这一研究成果有助于人类进一步认识自身免疫系统, 在 DNA 修复和控制、人类疾病的治疗方面具有重要意义.

蛋白质的泛素化, 其实是蛋白质翻译后修饰的一种. 蛋白质翻译后修饰, 是指在 mRNA 被翻译成蛋白质后, 对蛋白质上个别氨基酸残基进行共价修饰的过程. 蛋白质翻译后修饰在生命体中具有十分重要的作用. 人类基因组计划的完成是 20 世纪最伟大的科技成果之一. 在对人类基因组进行仔细研究后发现, 人类基因大约有 30000~50000 个^[1], 这仅仅是线虫和果蝇染色体基因数的 3~5 倍. 而生命体内复杂生命过程的调控, 仅仅靠这样小数目的基因远不能满足需要. 因此, 蛋白质翻译后修饰过程尤为重要. 它使蛋白质的结构更为复杂, 功能更为完善, 调节更为精细, 作用更为专一. 细胞内许多蛋白质的功能, 是通过动态的蛋白质翻译后修饰来调控的; 细胞的许多生理功能, 例如细胞对外界环境的应答^[2], 也是通过动态的蛋白质翻译后修饰来实现的. 人类生命过程的复杂性不单是基因直接表达的结果, 正是蛋白质翻译后修饰, 使得一个基因并不只对应一个蛋白质, 从而赋予人类生命过程更多的复杂性.

1 蛋白质翻译后修饰过程

在真核动物细胞中有 20 多种蛋白质翻译后修

过程, 常见的有泛素化、磷酸化、糖基化、脂基化、甲基化和乙酰化等. 近年来, 随着人类基因组和蛋白质组学工作的开展, 关于蛋白质翻译后修饰的研究也取得一系列进展.

1.1 泛素化

一直以来, 人们都忽视了蛋白质水解酶参与的细胞功能的调控. 泛素和与其相关的蛋白水解酶的发现, 给整个科学界带来了革命性的影响. 泛素由 76 个氨基酸组成, 高度保守, 普遍存在于真核细胞内, 故名泛素. 共价结合泛素的蛋白质能被蛋白酶识别并降解, 这是细胞内短寿命蛋白和一些异常蛋白降解的普遍途径. 与消化道内进行的蛋白质水解不同, 从泛素与蛋白的结合到将蛋白水解成小的肽段, 整个水解过程需要能量参与^[3]. 人们开始意识到泛素-蛋白酶系统是一个对于真核细胞非常重要的调节系统.

(1) 泛素-蛋白酶系统. 泛素-蛋白酶系统是存在于所有真核生物细胞的调控系统^[4]. 20 世纪 70~80 年代, 泛素调节蛋白质降解的机理之谜被揭开(图 1), 降解过程中需要三种酶的参与: 泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素蛋白质连接酶(E3)^[5~7]. 泛素化降解蛋白的过程中对蛋白的特异性识别依赖 E3. 由 E2s 和 E3s 介导的泛素化过程可以被去泛素化酶(DUBs)逆转(图 2). 目前发现的 DUBs 可分为两大类: 泛素碳端水解酶(ubiquitin C-terminal hydrolases, UCHs)和泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific pro-

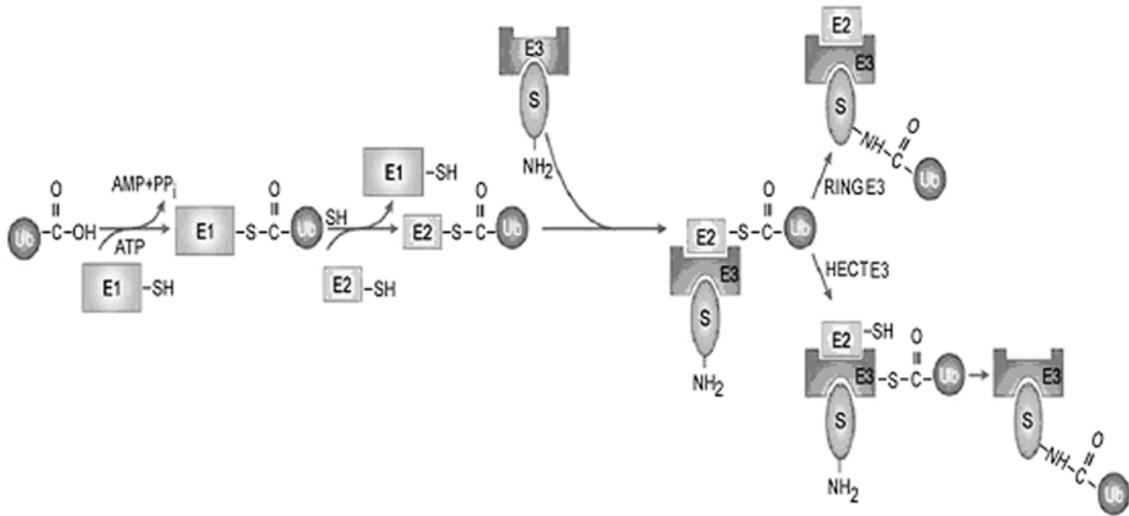


图1 泛素-蛋白酶系统对蛋白特异性水解机理^[7]

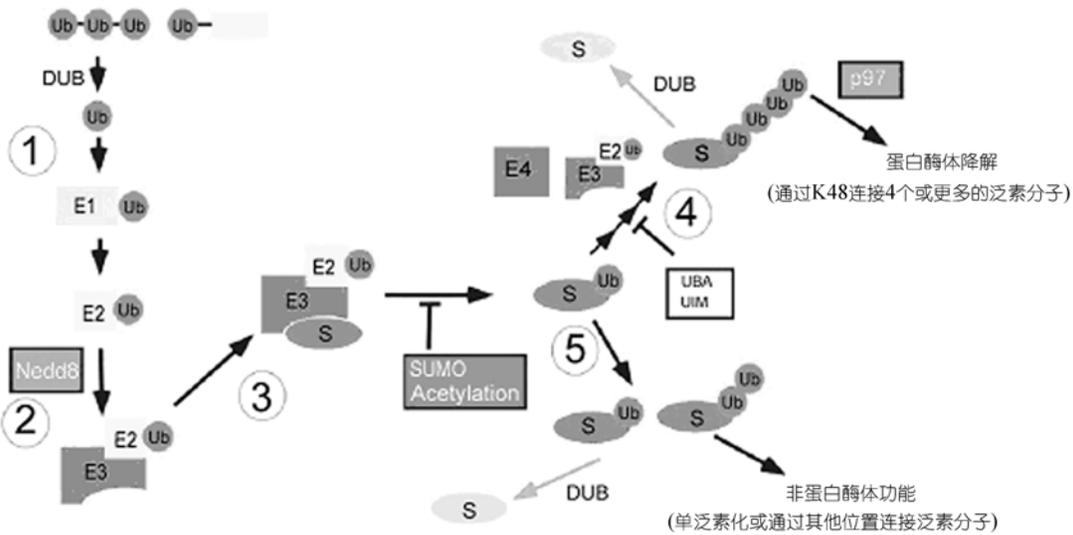


图2 DUBs参与的泛素化调控^[8]

cessing proteases, UBPs), 两者都是半胱氨酸水解酶^[8]. 通常情况下, UCHs主要水解羰基端的酯和泛素的氨基键, 也可以分解泛素前体, 生成活泼的泛素分子; UBPs分解泛素多聚体链.

(2) 泛素化在生命体中的作用. 泛素化对于细胞分化、细胞器的生物合成、细胞凋亡、DNA 修复、新蛋白生成、调控细胞增殖、蛋白质运输、免疫应答和应激反应等生理过程都起到很重要的作用.

Bence等^[9]发现, 蛋白的沉积可直接削弱泛素-蛋白酶系统的功能. 两种不相关但有聚合倾向的蛋白的瞬时表达, 几乎可以完全抑制泛素-蛋白酶系统. 由于泛素介导的蛋白质水解在调节细胞活动中的重

要地位, 引起蛋白聚集的潜在机制将导致细胞的紊乱和细胞凋亡.

神经元包含体中含有泛素化的纤维状蛋白沉积物, 是很多人神经退行性疾病如老年痴呆、帕金森病的主要特征^[10,11]. Engelder 等^[11]发现 Lewy 体中存在泛素连接酶E3 SIAH-1, SIAH-2 与synphilin-1的相互作用. Synphilin-1/SIAH复合物无法水解, 导致生成了大量泛素化的细胞内含物. 与synphilin-1的情况类似, 在完整的细胞内, SIAH-2 与 α -synuclien作用使之单泛素化, 单泛素化蛋白是无法被蛋白水解酶特异性地水解. 如果泛素-蛋白酶系统无法水解蛋白, 会导致细胞内含物的形成. Layfield等^[12]通过在分子

水平检查含泛素的包含体,对包含体中出现泛素化蛋白给予了新的解释:包含体中泛素化蛋白的出现,不能说明是由泛素介导的蛋白质水解的失调所引起的,而可能是细胞二级的、保护性的反应.泛素化很可能是一个后续过程.在这样一个假设模型下,其他因素更易促进包含体的形成.

泛素化也是组蛋白修饰的一种重要形式,组蛋白的H2A和H2B是泛素化多发位点,已经找到了组蛋白H2B泛素化酶^[13-15],并且发现组蛋白H2B泛素化和组蛋白甲基化存在关联^[16].Wang等^[17]对一种E3 hPRC1L (human polycomb repressive complex 1-like)进行纯化,并对其功能进行确认,发现hPRC1L特异性地作用于组蛋白H2A,对核小体组蛋白H2A的Lys¹¹⁹单泛素化.另外,*S. cerevisiae* H2B C端的Lys¹²³是E3 Rad6的作用底物,这种修饰对减数分裂和有丝分裂都很重要.TBP相关复合物Taf_{II} 250被证明能泛素化修饰H1,这也可能和转录有关^[18].

激活子的泛素化对于转录激活是十分重要的.2001年Salghetti等^[19]提出,泛素化可以作为激活作用和激活子重新构造的双信号,调节TAD功能.E3 Met30使转录激活子VP16 TAD泛素化.

在对p53的研究中发现,HAUSP (herpes virus-associated ubiquitin specific protease)是一种在体内外能对p53去泛素化的蛋白,在Mdm2存在下仍可稳定p53^[20].在体内外,COP1可作为泛素蛋白连接酶特异性地与p53结合,然后依靠泛素-蛋白酶系统将其水解,阻止p53介导的转录和细胞凋亡^[21].

1.2 磷酸化

磷酸化是通过蛋白质磷酸化激酶将ATP的磷酸基转移到蛋白的特定位点上的过程.大部分细胞过程实际上是被可逆的蛋白磷酸化所调控的,至少有30%的蛋白被磷酸化修饰^[22,23].磷酸化的作用位点为蛋白上的Ser, Thr, Tyr残基.在磷酸化调节过程中,细胞的形态和功能都发生改变.

可逆的磷酸化过程几乎涉及所有的生理及病理过程(图3),如细胞信号转导、肿瘤发生、新陈代谢、神经活动、肌肉收缩以及细胞的增殖、发育和分化等.Fisher和Krebs因其在蛋白质可逆磷酸化作为一种生物调节机制方面的研究而获得1992年诺贝尔生理学及医学奖.

在细胞信号转导过程中,作为细胞信号的一些

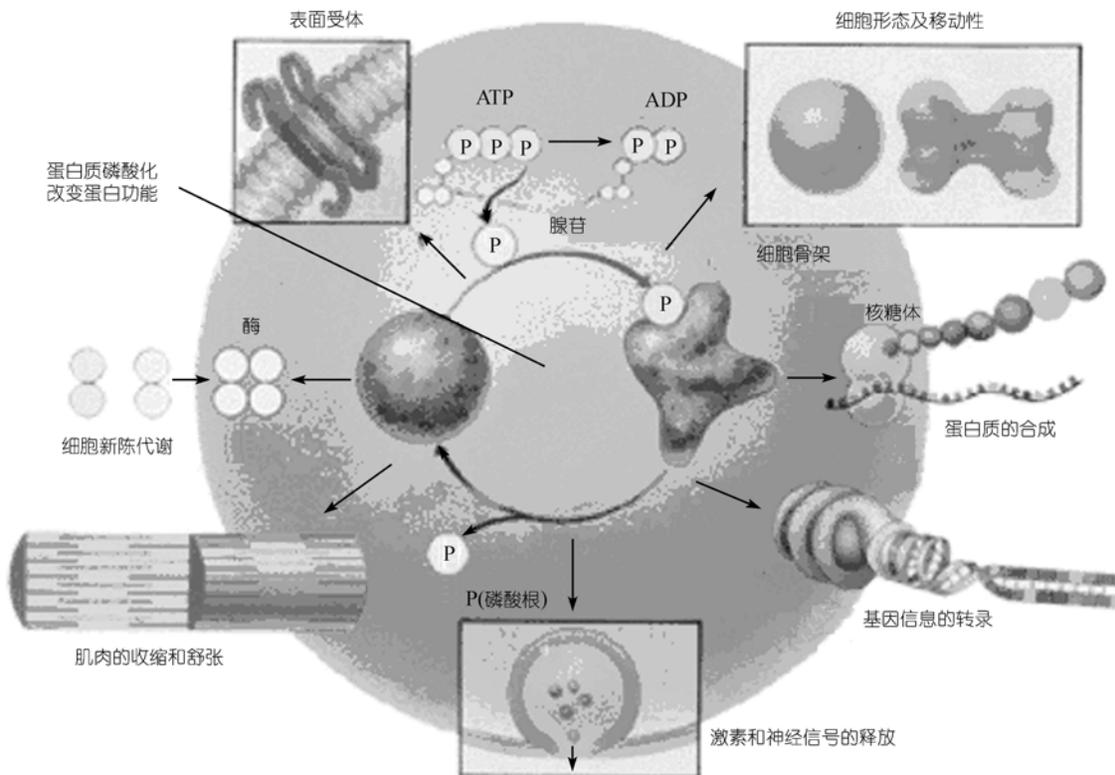


图3 磷酸化调节细胞过程

激素或细胞因子,与细胞膜受体或细胞内受体结合并被激酶激活,激素或信号因子随着激酶的磷酸化也被磷酸化,引起细胞内的信号效应。

在癌症研究中发现,微管蛋白的磷酸化可能导致癌症的发生。细胞中使用“最后检验点策略”(LCP)控制细胞凋亡,即将含有硝基酪氨酸的 α -微管蛋白组装到微管上,这将导致微管功能失常而最终导致细胞凋亡。但如果微管蛋白酪氨酸连接酶(TTL)被磷酸化,将可能使细胞“躲过”LCP控制的细胞凋亡,从而最终发展成为癌细胞^[24]。

在DNA新陈代谢的研究中发现,细胞中DNA损伤可导致人的复制蛋白A(RPA)32 kD亚基N端的过度磷酸化,这有助于调控DNA的新陈代谢,促进DNA修复。有数据显示,过度磷酸化会导致RPA构象改变,降低DNA复制的活性,但不会影响DNA的修复^[25]。

Cabrejos等^[26]研究了脊椎动物蛋白激酶CK2催化通用转录因子TF A, TF E, TF F和RNA聚合酶(RNAP)的磷酸化作用。结果显示,TF A, TF E和TF F最大的亚单元被CK2全酶磷酸化,RNA聚合酶的214 kD和20.5 kD亚基被CK2磷酸化;TF A, TF F和RNAP的磷酸化促进了Ad-MLP启动子在TATA box上形成复合物,其中TF F的磷酸化促进转录,RNA聚合酶的磷酸化则对转录有明显的抑制作用。

Maile等^[27]在对组蛋白磷酸化的研究中发现,果蝇通用转录因子TF D亚单位TAF1的C端激酶结构域(carboxyl-terminal kinase domain, CTK)对组蛋白H2B上进化保守的丝氨酸33(H2B-S33)进行磷酸化。细胞周期调节基因*string*和分割基因*giant*的启动子H2B-S33的磷酸化与转录活性相关。

Evans等^[28]在对肝炎病毒C(HCV)非结构蛋白5A(NS5A)的研究中发现,RNA的有效复制需要HCV NS5A和hVAP-A(human vesicle-associated membrane protein-associated protein A)的相互作用。进一步的研究发现,抑制NS5A磷酸化的适应性突变,可促进其与hVAP-A的结合。NS5A的磷酸化负向调节滤过性

病毒RNA的复制。

Jones等^[29]发现了一个新的调控SHP-1的机制:通过蛋白激酶C α 催化SHP-1 C端Ser⁵⁹¹磷酸化,磷酸化负向调节SHP-1的活性,即SHP-1的磷酸化导致它在体外对Vav1酪氨酸去磷酸化能力的降低,进而导致底物酪氨酸磷酸化程度加深。

李艳梅等^{1,2)}研究发现蛋白质的磷酸化通过氢键作用从而改变蛋白的局部构象。在对c-Fos蛋白C端结构域上的磷酸化修饰的研究中,发现S362的磷酸化引发了局部构象的改变进而影响turn结构的稳定性³⁾。另外采用MALDI-TOF MS对源自磷酸化蛋白的肽进行了源后裂解(PSD)的分析。探索出了不同氨基酸磷酸化的肽在MALDI-TOF MS中源后裂解的规律,提供了肽中磷酸化位点的信息^[30]。

1.3 糖基化

蛋白质的糖基化是低聚糖以糖苷的形式与蛋白上特定的氨基酸残基共价结合的过程。

蛋白质糖基化可以按照氨基酸和糖的连接方式分为四类:O位糖基化、N位糖基化、C位甘露糖化以及GPI(glycophosphatidylinositol)锚定连接^[31]。

O位糖基化多发生在临近脯氨酸的丝氨酸或苏氨酸残基上,糖基化位点处的蛋白多为 β 构型。O位多聚糖以逐步加接单糖的形式形成低聚糖。目前没有发现特异的蛋白序列作为糖基化位点。O位糖基化反应发生在细胞内两个部位,一是发生在高尔基体上,一是发生在细胞核或细胞质中^[32]。发生在高尔基体上的糖基化,起始于丝氨酸和苏氨酸羟基上连接N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖、海藻糖等的还原端。分泌蛋白和膜结合蛋白O位糖基化发生在N位糖基化及蛋白折叠之后^[33],在高尔基体顺面上完成^[34]。发生在细胞核和细胞质中的糖基化是在丝氨酸或苏氨酸残基上连接一个单糖:N-乙酰葡萄糖胺^[31]。在哺乳动物体内最常见的O位糖基化形式是由GalNAc转移酶催化的O-GalNAc糖基化,进而连接Gal, GalNAc或者GlcNAc部分。

O-GlcNAc糖基化从构象上分为两类:O- α -GlcNAc和O- β -GlcNAc,且此糖基化过程可逆^[31]。它

1) Luo S Z, Li Y M, Su X Y, et al. Hydrogen-bonding interactions induced by phosphorylation stereochemically influences the local structure of peptides. Chem Biochem, 待发表

2) Luo S Z, LI Y M, Chen Z Z, et al. Synthesis and matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry study of phosphopeptide. Letters in Peptide Science, 2004, 10: 57-62

3) 李艳梅, 罗施中, 黄志平, 等. 利用 MALDI-TOF 鉴定蛋白质翻译后修饰位点的研究. 中国蛋白质组学第二届学术会议论文集, 大连, 2004. 66-67

主要有三个特征:糖基化位点与蛋白激酶作用位点相似;糖基化与磷酸化相互抑制,对很多蛋白有去磷酸化作用;*O*-GlcNAc糖基化高度动态,对细胞信号等能做出快速反应^[32]。

N位糖基化是在内质网上由糖基转移酶催化,在内分泌蛋白和膜结合蛋白的天冬酰胺残基的氨基上结合寡糖的过程。普遍认为N位糖基化发生在蛋白Asn-Xaa-Ser/Thr(Xaa为除脯氨酸外的所有氨基酸残基)序列上^[35],少数情况下Asn-Xaa-Cys序列也作为糖基化位点^[31]。

C位甘露糖化是将一分子 α -mannopyranosyl残基通过C—C键连接到色氨酸吲哚环C-2上,这种糖基化方式多发生在模体W-X-X-W, W-X-X-C或者W-X-X-F的第一个色氨酸残基上。GPI锚定连接指的是磷脂酰-纤维糖组在靠近蛋白C端部位结合,将蛋白连接到细胞膜上^[31,32]。

(1) 糖基化位点分析。糖基化位点的确定需要对蛋白进行消化水解、分离,并采用质谱(MS)或串联质谱(MS/MS)等检测手段。液相色谱(LC)与MS相结合,也为在水解混合物中确定糖基化位点提供了可靠的方法。Krokhin等^[36]利用MALDI技术对糖基化位点进行指认和确定,并着手糖肽先导物离子自动指认软件的开发工作。

(2) 糖蛋白的合成。糖蛋白的合成一直阻碍研究蛋白质糖基化对蛋白功能和结构的影响,当涉及到对类似物进行选择修饰时化学合成尤为困难。

2004年,Zhang等^[37]报道了一种共翻译合成法,以得到选择性糖基化修饰蛋白。被修饰的氨基酸可被基因编码。该法可广泛应用于其他类型的后修饰的蛋白合成。同时也提供了一种制备糖肽药物的潜在手段。

近期研究发现人类胃肠道病原体(*Campylobacter jejuni*)内N位糖基化途径,在*C. jejuni*及相关种类细菌*Campylobacter coli*。内O位糖基化途径也被确认,这为糖肽生物合成的研究提供了模型。上述两种细菌体内的N和O位糖基化途径与真核生物体内的相似,具有相似的生物学功能,其基因类似物在其他有机体内也能找到,连接到糖肽上的多聚糖复合物具有普遍的生物合成前体^[38]。

(3) 糖基化在生命体中的作用。蛋白质的糖基化

影响蛋白的功能^[39],在许多生物过程中起着重要的作用,如免疫保护、病毒的复制、细胞生长、细胞与细胞之间的黏附、炎症的产生等。很多蛋白,如转录因子、核小孔蛋白、热休克蛋白、RNA聚合酶、致癌基因翻译产物、酶等,都发现了糖基化这种翻译后修饰方式^[40](图4)。糖基化异常经常导致疾病的发生。在帕金森病、风湿性关节炎和其他与自由基相关的疾病患者体内,检测到铁转移蛋白糖基化水平过高。铁转移蛋白是一种糖基化的金属转运血清蛋白,糖基化稳定了铁转移蛋白,间接地调节了铁离子的平衡^[41]。另有大量文献报道糖基化的紊乱与迅速发展的肌营养不良相关:Muntoni等^[42]通过对糖基转移酶活性的鉴定,发现导致肌肉营养失调的新机制。在所有的病例中,普遍存在非正常的 α -dystroglycan糖基化。

李艳梅等¹⁾研究了*O*-GlcNAc修饰的功能性多肽的合成,*O*-GlcNAc修饰对多肽构象和生物功能的影响及*O*-GlcNAc和*O*-phosphorylation修饰对调节作用的联系与影响。

基于糖基化在生物体内的重要作用,以糖基化作为治疗位点的药物也相继问世,治疗机制是对于相应的酶进行调节。含亚氨基的糖是单糖的模拟物,它用N原子替代了环上的O原子。亚氨基糖家族可以抑制许多糖基化酶,包括ER α -葡糖苷酶,以及神经酰胺特异性糖基转移酶。对ER α -葡糖苷酶低水平的抑制,可以治疗滤过性病毒感染而不危害宿主细胞。亚氨基糖*N*-nonyl-deoxynojirimycin (*N*-nonyl-DNI)对肝炎病毒B动物模型、小牛腹泻病毒模型和肝炎病毒C体外模型,都具有抗病毒活性^[43]。

1.4 脂基化

蛋白质脂基化为长脂肪链通过O或者S原子与蛋白质缀合得到蛋白缀合物的过程,通常是蛋白质分子中半胱氨酸残基的S键被棕榈酰基乙酰化,或者被法呢基烷基化。这两种脂肪链通常共同修饰同一个蛋白质分子,通过脂肪链与生物磷脂膜良好的相容性,将蛋白质固定在细胞膜上^[39]。

脂蛋白是一类膜结合蛋白,其特定的脂肪链修饰,帮助这类蛋白在细胞膜上定位,并进一步协助该蛋白发挥生物功能。近年来生物物理学研究发现,脂蛋白只有固定在膜上之后,才有参与生物功能的活

1) 陈永湘,李艳梅,Schlummer S,等. *O*-GlcNAc修饰多肽的化学合成与功能研究. 第三届全国化学生物学学术讨论会论文摘要集. 长沙, 2004. 3~15

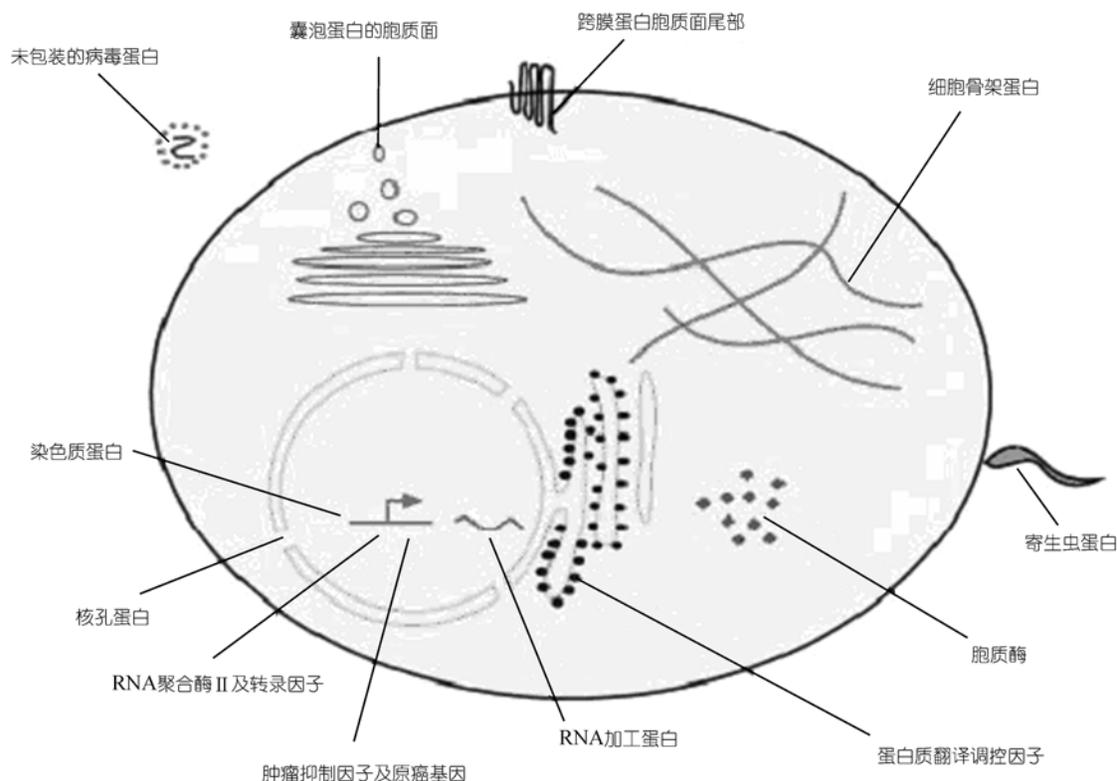


图4 细胞中涉及糖基化的蛋白质^[40]

性^[2].

(1) 脂蛋白的合成. 近10年来, 人们采用基因工程和有机合成相结合的方法合成脂蛋白缀合物, Waldmann等^[44]在此方面的研究取得了重大突破. 他们应用酶和贵金属作为催化剂, 利用固相合成法合成脂修饰的多肽. 合成中引入一种人工的连接基团, 并使用马来酰亚胺己酸(MIC)作为保护基. 通过该基团与Cys形成S键, 将多肽片段与通过基因工程得到的截断了C端的蛋白质结合起来. 体外实验发现, 这些蛋白具有很好的生物功能. SPR测试发现脂蛋白和膜的结合力比较强, 通过荧光显微技术观察这种脂蛋白在细胞中的分布情况, 发现与生物体内的现象非常接近. 2003年, Waldmann等^[45]又提出了合成脂基中含有光学活性苯甲酮的法呢基修饰N-Ras七肽的方法. 该合成策略是以固相合成带有N端七肽的片段聚合为基础. 其中, 合成的七肽缀合物带有不同法呢基类似物修饰的半胱氨酸甲酯. 运用该法还合成了与四种法呢基类似物相连的24肽, 其中的两种光学活性缀合物与人致癌N-RasG12VΔ181相连. 细胞转化

实验显示这种半合成蛋白仍保持生理活性.

(2) 脂基化在生命体中的作用. 脂基化对于生物体内的信号转导过程起着非常关键的作用, 脂基化蛋白相当于细胞信号转导的开关. 在人体信号转导过程中, 从生长因子到基因表达的调控需要经过一系列的过程. 信号从生长因子受体转导到含有SH2结构域的接头蛋白, 再继续转导到鸟苷酸交换因子, 然后转导到Ras蛋白, Ras蛋白与GTPd的结合, 对整个信号转导过程起到开关的作用. Ras在生物体内的循环过程如图5所示. 近年来提出Ras蛋白是一种很有效的药物靶点.

非正常修饰的脂蛋白, 会影响信号转导的过程. 在30%的人体肿瘤中都发现了Ras蛋白的变体, 其中80%肿瘤为恶性^[46]. 在细胞内, 产生非正常修饰的原

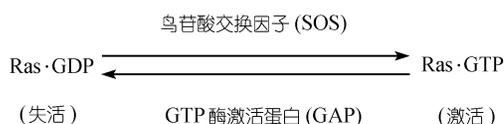


图5 Ras蛋白在细胞内循环示意图

因是Ras蛋白发生了点突变,是化学信号刺激还是基因变异导致了Ras蛋白的突变,尚不清楚.以蛋白质脂基化作为药物靶点已取得一定成绩.法呢基转移酶抑制剂在抗肿瘤治疗中具有很好的疗效^[47],而对于正常的细胞却没有任何毒性.同样,棕榈酰基转移酶抑制剂也表现出抗肿瘤特性,对于乳腺癌、前列腺癌等均有作用.

1.5 甲基化

蛋白质的甲基化同其他翻译后修饰过程一样,机理复杂,在生命调控过程中地位重要.蛋白质的甲基化修饰是在甲基转移酶催化下,在赖氨酸或精氨酸侧链氨基上进行的甲基化.另外也有对天冬氨酸或谷氨酸侧链羧基进行甲基化形成甲酯的形式,这里主要关注前一种甲基化形式.甲基化增加了立体阻力,并且取代了氨基的氢,影响了氢键的形成.因此,甲基化可以调控分子间和分子与目标蛋白的相互作用.

(1) 精氨酸甲基化分类.1967年,Paik和Kim发现了精氨酸的甲基化,并发现了它在信号转导、转录活化、蛋白质分拣等生命过程中所起的作用.许多蛋白都可以进行精氨酸甲基化.真核细胞中,甲基化精氨酸有三种: N^G -单甲基化精氨酸(MMA), $N^G N^G$ (不对称)二甲基化精氨酸(aDMA)和 $N^G N'^G$ (对称)二甲基化精氨酸(sDMA).不同蛋白的精氨酸残基采取不同的甲基化形式,有些蛋白也可采用多种甲基化形式.异核核糖核酸蛋白(hnRNPs)和其他RNA结合蛋白的甲基化经常是在RGG三肽片段上.同时,所有RGG片段中的精氨酸甲基化,都是单甲基化和不对称二甲基化而不是对称二甲基化;在RXR片段和RG片段中也是不对称二甲基化;而髓鞘碱蛋白(myelin basic protein, MBP)的精氨酸残基不仅可以单甲基化,而且还可以进行对称二甲基化;SmD1蛋白和SmD3蛋白中的精氨酸残基进行对称二甲基化.与hnRNPs不同,髓鞘碱蛋白,SmD1蛋白和SmD3蛋白中甲基化的精氨酸位于GRG三肽片段中,这说明精氨酸残基前后一两个位置上的氨基酸种类不同,可能影响其甲基化形式.

(2) 组蛋白上的甲基化修饰.组蛋白对于转录过程至关重要,它是通过对其末端的化学修饰作用如磷酸化、乙酰化和甲基化等参与细胞核中生命活动.组蛋白赖氨酸和精氨酸的甲基化同转录调节和异染

色体的形成有关^[48].总之,组蛋白乙酰化水平增加与转录活性增强有关,而组蛋白甲基化修饰的结果则相对复杂,它可以是转录增强或转录抑制.

() 组蛋白赖氨酸甲基化.组蛋白赖氨酸甲基化发生在H3-K4, H3-K9, H3-K27, H3-K36, H3-K79和H4-K20上,还可发生于H1 N端. H3-K9, H3-K27, H4-K20的甲基化与染色体的钝化过程有关,而H4-K9的甲基化可能与大范围的染色质水平的抑制有关. H3-K4, H3-K36, H3-K79位的甲基化与染色体转录激活过程有关,其中H3-K4的单甲基化修饰可以对抗H4-K9甲基化所导致的基因抑制^[49].

2001年,Hisashi等^[50]首先证明了组蛋白H3-K9甲基化和DNA甲基化的关联.对豚胞菌*N. crassa*中DNA甲基化缺陷的突变株进行基因扫描,鉴定出一个包含SET结构域的基因*dim-5*. Dim-5是一个H3组蛋白甲基转移酶(HMTase),其对H3-K9的甲基化能够直接或间接通过一个对甲基化H3-K9位点有亲和作用的介导子来结合DNA甲基化酶.2002年,Jackson等^[51]对拟南芥*kryptonite*突变株的功能分析进一步证实了这一关系.

Shi等人^[52]研究发现,胺氧化酶的核同源物LSD1(KIAA0601)可作为组蛋白去甲基化酶和转录共抑制子. LSD1专一地使组蛋白H3 Lys4去甲基化.赖氨酸去甲基化反应通过氧化反应发生,产生甲醛.重要的是, LSD1经RNAi抑制后,引起H3 Lys4甲基化的增加和相应的目标基因的抑制,表明LSD1通过组蛋白去甲基化抑制转录.这个研究揭示了组蛋白甲基化是通过组蛋白甲基化酶和去甲基化酶进行动态调控的.

() 组蛋白精氨酸甲基化.组蛋白精氨酸甲基化位点为H3-R2, H3-R4, H3-R17, H3-R26,它们都可以增强转录.

虽然人们早已了解组蛋白甲基转移酶,但尚未发现去甲基化酶.2004年,Cuthbert等^[53]提出了“deimination”的过程,即将组蛋白的精氨酸转变为瓜氨酸,用以拮抗在精氨酸上的甲基化.随后,Wang等^[54]的研究显示, PAD4 (peptidyl arginine deiminase 4)通过将甲基精氨酸转换成瓜氨酸,调节组蛋白精氨酸甲基化,同时生成甲氨.研究发现PADI4 (peptidyl arginine deiminase 4, Wang等将其缩写为PAD4)特异地作用于H3末端的精氨酸残基R2, R8, R17和R26,使之转变为瓜氨酸.由PAD4介导的deimination过程

阻止了由CARM1介导的精氨酸甲基化。虽然单甲基仍然可以进行deimination过程,精氨酸的二甲基化则阻碍了PAD4的deimination过程。在对内源启动子的体内靶向实验显示,PAD4可以抑制激素受体介导的基因活化。当这个激素介导的基因转录活性降低时,PAD4被*pS2*启动子“招募”,说明PAD4通过调节组蛋白精氨酸甲基化和瓜氨酸化来调控基因表达^[53,54]。

Trojer等^[55]的研究确认了丝状真菌*Aspergillus nidulans*中三种独特的蛋白质精氨酸甲基转移酶(PRMTs),利用特异性抗体实验证明体内的组蛋白精氨酸上存在甲基化,同时*A. nidulans*中高水平的PRMTs对特定核心组蛋白具有专一性,说明这些酶在调节染色质的活性中具有重要功能。研究发现,当它们以GST融合蛋白的形式表达时,均显示出固有的组蛋白甲基转移酶活性。其中精氨酸甲基转移酶A(RmtA)和精氨酸甲基转移酶C(RmtC)分别同人类蛋白质PRMT1和PRMT5显示出显著的序列同源性,精氨酸甲基转移酶B(RmtB)和人或鼠的PRMT3也有远程相关。天然的RmtA和重组的RmtA均特异地催化组蛋白H4-R3甲基化,且由重组RmtA催化的组蛋白H4甲基化,影响由p300/CBP催化的乙酰化。RmtB-GST融合蛋白特异地催化组蛋白H3、H4和H2A的甲基化。

(3) 蛋白质甲基化在生命体中的作用。组蛋白上的甲基化,不仅在真核细胞染色质的遗传外修饰中占有中心地位,对细胞分化、发育、基因表达、基因组稳定性及癌症研究等均有深远的影响。其他类型的甲基化及甲基化酶在生命体中也有十分重要的作用。蛋白质甲基化的异常或甲基化酶的突变常会导致疾病的发生。例如单甲基化的精氨酸和不对称二甲基化的精氨酸是氮氧化合物NOS抑制剂,许多患有心血管疾病的人体内,已发现异于常人的这种氨基酸。精氨酸甲基化的不可逆性,可能使发生甲基化的蛋白质影响NOS的活性。在自体免疫的疾病中,也已经发现了几种甲基化的蛋白,如在患有多发性硬化疾病的患者体内已发现了髓鞘碱蛋白的抗体。Chuiikov等^[56]发现一个新的调节p53功能的机制,它是通过Set9催化的赖氨酸甲基化完成的。Set9特异性地甲基化p53的C端调节区域的一个残基。甲基化的p53被限制在细胞核里,稳定性增强。Set9以依靠p53甲基化位点的方式调节p53靶向基因的表达。Set9、p53和辅助因子产物复合物的晶体结构,提供了通过

赖氨酸甲基转移酶识别p53的分子基础。

1.6 乙酰化

乙酰化也是细胞内蛋白质翻译后修饰的一种重要形式。组蛋白等许多蛋白都可以发生乙酰化。

(1) 组蛋白动态乙酰化修饰。近年来,对于组蛋白乙酰化的研究开展较多。可逆的组蛋白乙酰化修饰已发现40多年,发生在核心组蛋白N端的赖氨酸上。组蛋白的乙酰化,是由组蛋白乙酰转移酶(HATs)催化的,去乙酰化由组蛋白去乙酰酶(histone deacetylases, HDs或者HDACs)催化的。核心组蛋白N端的末端富含赖氨酸,生理条件下带正电,它可与带负电的DNA或相邻的核小体发生作用,导致核小体构象紧凑及染色质高度折叠。乙酰化使组蛋白与DNA间的作用减弱,导致染色质构象松散^[57,58],这种构象有利于转录调节因子的接近,从而可以和转录因子结合,促进基因的转录。去乙酰化则抑制基因转录。人们认为,组蛋白N端结构域的乙酰化导致染色体局部解旋,这是DNA重新包装的必要不充分条件。现在已经发现了几种不同的HATs和HDs,其中CBP/p300可能是最重要的,它可以和多个转录调节因子相互作用。组蛋白乙酰化和去乙酰化的半衰期只有几分钟,这种持续、快速的竞争性反应的作用尚不清楚。同时,这种变化除了对乙酰化水平高低快速转换起作用外,它本身是否和染色质的转录有关也不明了。有研究显示,这种变化可能直接与基因转录有关^[59]。

正常被抑制的区域高乙酰化或正常具有转录活性的区域去乙酰化,都可以导致各种紊乱,诱发与发育、增殖相关的疾病,例如白血病、皮肤癌、脆性X染色体综合征以及大拇指症候群。Harel-Bellan^[60]详细介绍了乙酰化和去乙酰化过程中的异常导致的疾病,作者在此不再赘述。在体内,增强子活性的变化可以调节重组酶与染色体重组信号序列结合的能力,从而调节V(D)J重组,但这个变化的分子机制尚不清楚。McMurry等^[61]研究了组蛋白H3乙酰化对V(D)J重组报告基因和T细胞受体 α/δ 位点的影响。实验显示了增强子活性在H3乙酰化中长期的调节作用,并且H3乙酰化水平与V(D)J重组紧密相连。由此,H3高乙酰化可能是联系增强子活性与V(D)J重组能力的分子水平机制。

多聚谷氨酰胺疾病是一种神经退行性遗传病,

是由致病基因CAG重复片段的扩大引起的。研究显示,在扩大的多谷氨酰胺诱导的疾病中,蛋白的乙酰化和去乙酰化的失衡是一个关键的过程。通过遗传学或药理学的方法,减少相对酶组例如组蛋白去乙酰化酶,可使平衡恢复。随着对HDACs研究的深入,使得特异的HDAC家族蛋白抑制剂的发展成为可能,并且这些化合物可以被有效地用到这些疾病的治疗中^[60]。

(2) 其他蛋白上的乙酰化。在微管蛋白乙酰化的研究中,Hubbert等^[62]发现组蛋白去乙酰化酶HDAC6能逆转微管蛋白乙酰化的翻译后修饰。有证据显示,降低微管蛋白乙酰化程度,可以增强细胞的移动性,减少微管蛋白乙酰化的同时也减弱了微管的稳定性。然而,Palazzo等^[63]研究发现,微管的稳定性与微管蛋白乙酰化程度没有直接关系。细胞移动性的改变,是由于微管蛋白乙酰化程度的不同造成的。

2004年,Nguyen等^[64]发现眼癌肿瘤抑制蛋白(pRb)的乙酰化与细胞分化包括骨骼肌形成等相关,提出乙酰化可以调节pRb的特异性分化功能。眼癌肿瘤抑制蛋白可以诱导生长停滞和细胞分化。研究发现,辅助激活因子p300可以乙酰化眼癌肿瘤抑制蛋白,但眼癌肿瘤抑制蛋白乙酰化的生物学作用还不清楚。p300相关因子(P/CAF)的乙酰转移酶结构域在体内可与眼癌肿瘤抑制蛋白直接作用,调控眼癌肿瘤抑制蛋白的乙酰化水平。同时,不同细胞的P/CAF也可相互作用。实验显示,乙酰化不影响由眼癌肿瘤抑制蛋白介导的生长停滞和E2F的转录抑制活性,相反,眼癌肿瘤抑制蛋白介导的细胞周期终止和成肌基因的表达都需要乙酰化的参与。

2 不同翻译后修饰过程的相互协调与影响

在体内,各种翻译后修饰过程不是孤立存在的。在很多细胞活动中,需要各种翻译后修饰的蛋白共同作用。例如在信号转导的过程中,位于细胞膜外侧的细胞外信息受体和相应的响应器(一般都是糖基化的蛋白质)与相应的配体结合,这些糖蛋白会将细胞所处环境中的刺激信号导入细胞膜,并首先转导到这类与膜结合的脂蛋白上,而后再通过脂蛋白向下级的蛋白质或激酶转导。同时,在绝大多数的信号转导过程中,脂蛋白都是另外一系列蛋白质磷酸化的

开端,这些磷酸化过程分别受到特定的激酶调节,是信号转导过程中的主体。

对于同一个蛋白可以拥有一种以上的后修饰过程。各种翻译后修饰形式相互影响、相互协调。磷酸化与糖基化在很多方面都具有相似性,尤其是动力学特点和在细胞内普遍存在的特点,如在转录因子、致癌产物、酶中都存在。目前已经得到的数据显示,N-乙酰葡糖基的加成和脱去,在细胞中可以当作一种调节机制,并且磷酸化和糖基化过程不但具有高度的相似性,并且二者是可以循环往复的,这两者之间的关系如同“阴阳”关系^[65]。例如RNA聚合酶控制的基因表达过程中,磷酸化和糖基化对修饰起到了不同的作用。RNA聚合酶C端区域是高度糖基化的,聚合酶从进入核到与转录因子作用的过程中,蛋白质会迅速并且完全的发生去糖基化,同时磷酸化。这说明RNA聚合酶只有在非磷酸化时才可能有大量的乙酰葡糖基团,并且磷酸化和糖基化是分别在细胞膜的内外两侧发生的,因此推测糖基化同磷酸化的作用位点相同,并影响磷酸化程度。又如,微管结合蛋白Tau蛋白也是多糖基化的,在这个蛋白上有超过12个的糖基化位点,每个分子一般含有四个GlcNAc修饰位点。在AD病人的脑中Tau蛋白形成一种过度磷酸化的双螺旋缠丝。阻碍Tau蛋白与微管结合的磷酸化的Ser262残基,在正常情况下应是糖基化的。因此,可以猜测这个位置的非正常磷酸化是由于糖基化的缺失而产生的^[65]。

组蛋白同时可以被甲基化和乙酰化共同修饰(图6)^[66]。组蛋白上乙酰化和甲基化的主要作用位点是组蛋白H3和H4末端保守的赖氨酸残基。组蛋白乙酰化修饰贯穿整个细胞周期,而甲基化修饰多发生在G2期以及异染色质组装过程^[66]。有实验显示,组蛋白末端赖氨酸的乙酰化和甲基化具有修饰的特殊关联性,这种关联性可能具有对抗或者协同的生物学功能。例如制备具有转录活性的染色质时,高乙酰化的H4是甲基化组蛋白H3的优先作用底物,说明这些修饰形式可能共同作用以促进转录,但是它们的作用机制目前尚不明了。

3 结语

由于蛋白质翻译后修饰并不是直接由基因决定的,研究蛋白质翻译后修饰对蛋白质组学的研究具有更重要的意义,因此诞生了“翻译后修饰的蛋白质

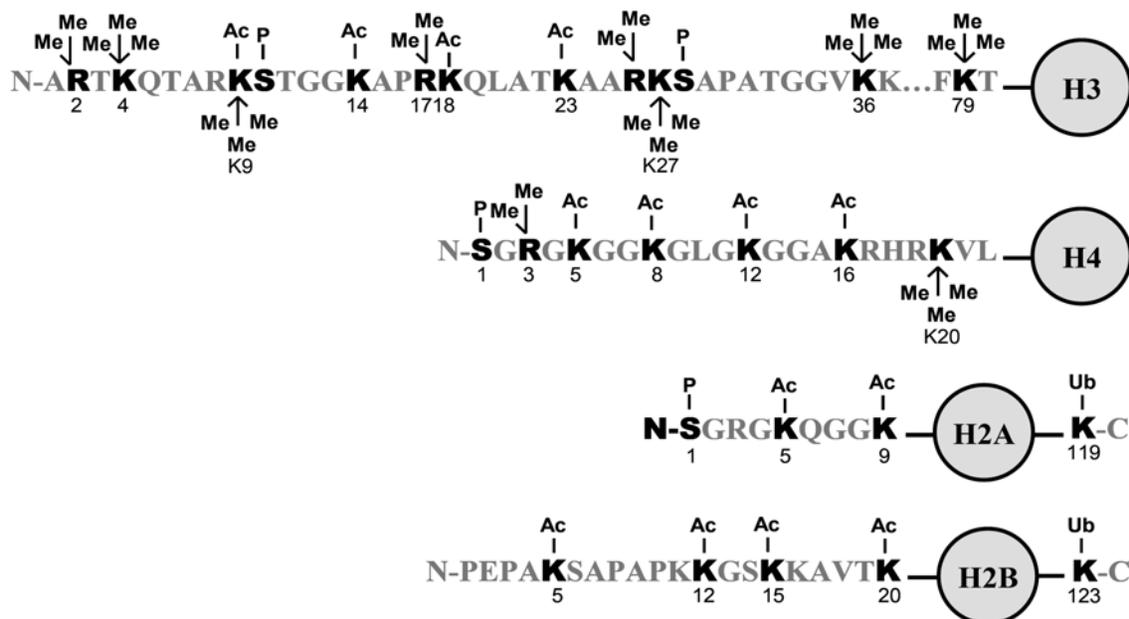


图6 组蛋白上的翻译后修饰

组学”。翻译后修饰的蛋白质组学是目前国际上的一个研究热点。翻译后修饰的蛋白质组学研究，不仅有助于理解翻译后修饰在生命过程中的重要意义，还对未来的药物开发提供了极大的保证。找到非正常细胞中变异的分子靶点，将有利于研究蛋白质的相互作用是如何被翻译后修饰过程控制。理解调控翻译后修饰过程因素，有利于在分子水平上揭示细胞过程和蛋白质网络的功能，最终可以指导针对分子的更准确的药物控制。可以预见，蛋白质翻译后修饰的模拟物在蛋白疗法中将是新的热点，它将成为21世纪有力的医疗武器^[67]。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 20272032, 20320130046)、教育部高等学校优秀青年教师教学和科研奖励基金资助项目。

参 考 文 献

- 1 Venter J C, Adams M D, Myers E, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291: 1304~1351 [DOI]
- 2 郭燕婷, 李艳梅, 赵玉芬. 脂蛋白合成新进展. *有机化学*, 2004, 24(7): 722~727
- 3 Hilt W, Wolf D H. The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61: 1545
- 4 Fang S, Weissman A M. A field guide to ubiquitylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61: 1546~1561
- 5 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Bio-*

- chem*, 1998, 67: 425~479 [DOI]
- 6 Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503~533 [DOI]
- 7 Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 169~178 [DOI]
- 8 Wilkinson K D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, 2000, 11: 141~148 [DOI]
- 9 Bence N F, Sampat R M, Kopito R R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 2001, (292): 1552~1555
- 10 Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M, et al. *A-synuclein* in Lewy bodies. *Nature*, 1997, 388: 839~840 [DOI]
- 11 Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, et al. Synphilin-1 associates with α -synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet*, 1999, 22: 110~114 [DOI]
- 12 Layfield R, Cavey J R, Lowe J. Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, 2003, 2: 343~356 [DOI]
- 13 Robzyk K, Recht J, Osley M A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 2000, 287: 501~504 [DOI]
- 14 Hwang W W, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu A G, et al. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell*, 2003, 11: 261~266 [DOI]
- 15 Wood A, Krogan N J, Dover J, et al. An E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a pro-

- moter. *Mol Cell*, 2003, 11: 267~274[DOI]
- 16 Sun Z W, Allis C D. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 2002, 418: 104~108 [DOI]
- 17 Wang H B, Wang L J, Erdjument-Bromage H, et al. Role of histone H2A ubiquitination in polycomb silencing. *Nature*, 2004, 431: 873~878[DOI]
- 18 Pham A D, Sauer F. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAF_{II}250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*, 2000, 289: 2357~2360[DOI]
- 19 Salghetti S E, Caudy A A, Chenoweth J G, et al. Regulation of transcriptional activation domain function ubiquitin. *Science*, 2001, 293: 1651~1653[DOI]
- 20 Li M, Chen D, Shiloh A, et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, 2002, 416: 648~653[DOI]
- 21 Dornan D, Wertz I, Shimizu H, et al. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, 2004, 429(6987): 86~92[DOI]
- 22 Ficarro S B, McClelland M L, Stukenberg P T, et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(3): 301~305[DOI]
- 23 Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol*, 2004, 339: 1025~1039[DOI]
- 24 Idriss H T. Three steps to cancer: how phosphorylation of tubulin, tubulin tyrosine ligase and *P*-glycoprotein may generate and sustain cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 54: 101~104
- 25 Binz S K, Sheehan A M, Wold M S. Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair*, 2004, 3: 1015~1024[DOI]
- 26 Cabrejos M E, Allende C C, Maldonado E. Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase transcription machinery. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, 93: 2~10[DOI]
- 27 Maile T, Kwoczynski S, Katzenberger R J, et al. TAF1 activates transcription by phosphorylation of Serine 33 in histone H2B. *Science*, 2004, 304: 1010~1014 [DOI]
- 28 Evans M J, Rice C M, Goff S P. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 13038~13043
- 29 Jones M L, Craik J D, Gibbins J M, et al. Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem*, 2004, 279(39): 40475~40483[DOI]
- 30 Huang Z P, Li Y M, Luo S Z, et al. Identification of phosphorylation site of phosphopeptide by MALDI-PSD mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(10): 131
- 31 Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 2004, (4): 1633~1649
- 32 Hart G W. Dynamic *O*-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 315~335[DOI]
- 33 Asker N, Baeckstrom D, Axelsson M, et al. The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before *O*-glycosylation and shares epitopes with the 'insoluble' mucin of rat small intestine. *Biochem J*, 1995, 308: 873~880
- 34 Roth J, Wang Y, Eckhardt A E, et al. Differential expression of cell surface sialoglycoconjugates on wild-type and cultured ehrlich tumor cells as revealed by quantitative lectin-gold ultrastructural cytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8935~8939
- 35 Gavel Y, von Heijne G. Statistical studies of *N*-glycosylated proteins have indicated that the frequency of nonglycosylated Asn-Xaa-(Thr/Ser) sequons increases toward the C terminus. *Protein Eng*, 1990, 3: 433~442
- 36 Krokhin O, Ens W, Standing K G, et al. Site-specific *N*-glycosylation analysis: matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectral signatures for recognition and identification of glycopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, (18): 2020~2030
- 37 Zhang Z W, Gildersleeve J, Yang Y Y, et al. A new strategy for the synthesis of glycoproteins. *Science*, 2004, 303: 371~373[DOI]
- 38 Szymanski C M, Logan S M, Linton D, et al. *Campylobacter*—a tale of two protein glycosylation systems. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(5): 233~238
- 39 Cassey P J. Protein lipidation in cell signaling. *Science*, 1995, 268: 221~225
- 40 Comer F I, Hart G W. *O*-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(38): 29179~29182 [DOI]
- 41 van Rensburg S J, Berman P, Potocnik F, et al. 5- and 6-glycosylation of transferrin in patients with Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Disease*, 2004, 19(1-2): 89~96[DOI]
- 42 Muntoni F, Brockington M, Torelli S, et al. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Current Opinion in Neurology*, 2004, 17 (2): 205~209 [DOI]
- 43 Dwek R A, Butters T D, Platt F M, et al. Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(1): 65~75 [DOI]
- 44 Bader B, Kuhn K, Owen D J, et al. Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature*, 2000, 403: 223~226[DOI]

- 45 Völkert M, Uwai K, Tebbe A, et al. Synthesis and biological activity of photoactivatable *N*-Ras peptides and proteins. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 12749~12758[DOI]
- 46 Peters C, Wagner M, Völkert M, et al. Bridging the gap between cell biology and organic chemistry: chemical synthesis and biological application of lipidated peptides and proteins. *Naturwissenschaften*, 2002, 89: 381~390[DOI]
- 47 Thutewohl M, Kissau L, Popkirova B, et al. Identification of mono- and bisubstrate inhibitors of protein farnesyltransferase and inducers of apoptosis from a peptidic library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11: 2617~2626[DOI]
- 48 Trievel R C. Structure and function of histone methyltransferases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2004, 14(3): 147~169[DOI]
- 49 Sims III R J, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics*, 2003, 19(11): 629~639[DOI]
- 50 Tamaru H, Selker E U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 2001, 414(6861): 277~283[DOI]
- 51 Jackson J P, Lindroth A M, Cao X F, et al. Control of CpNpG methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 2002, 416: 556~560[DOI]
- 52 Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 2004, 119(7): 941~953[DOI]
- 53 Cuthbert G L, Daujat S, Snowden A W, et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, 2004, 118(5): 545~553 [DOI]
- 54 Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science*, 2004, 306(5694): 279~283[DOI]
- 55 Trojer P, Dangel M, Bauer I, et al. Histone methyltransferases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a novel enzyme with a unique substrate specificity. *Biochemistry*, 2004, 43: 10834~10843[DOI]
- 56 Chuikov S, Kurash J K, Wilson J R, et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*, 2004, 432: 353~360[DOI]
- 57 Hansen J C, Tse C, Wolffe A P. Structure and function of the core histone *N*-termini: more than meets the eye. *Biochemistry*, 1998, 37: 17637~17641 [DOI]
- 58 Walia H, Chen H Y, Sun J M, et al. Histone acetylation is required to maintain the unfolded nucleosome structure associated with transcribing DNA. *J Biol Chem*, 1998, 17: 2865~2876
- 59 Waterborg J H. Dynamics of histone acetylation *in vivo*. A function for acetylation turnover? *Biochemistry and Cell Biology-biochimie et Biologie Cellulaire*, 2002, 80(3): 363~378[DOI]
- 60 Bodai L, Pallos J, Thompson L M, et al. Altered protein acetylation in polyglutamine diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, 10(23): 2577~2587 [DOI]
- 61 McMurry M T, Krangel M S. A role for histone acetylation in the developmental regulation of V(D)J recombination. *Science*, 2000, 287: 495~498[DOI]
- 62 Hubbert C, Amaris G, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 2002, 417(6887): 455~458[DOI]
- 63 Palazzo A, Ackerman B, Gundersen G G. Tubulin acetylation and cell motility. *Nature*, 2003, 421: 230[DOI]
- 64 Nguyen D X, Baglia L A, Huang S M, et al. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *The EMBO Journal*, 2004, 23(7): 1609~1618[DOI]
- 65 钱慰, 刘飞, 朱俐, 等. 蛋白质 *O*-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 蛋白磷酸化修饰的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(4): 623~628
- 66 Rice J C, Allis C D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13: 263~273[DOI]
- 67 Benjamin G D. Mimicking posttranslational modifications of proteins. *Science*, 2004, 303: 480~482[DOI]

(2005-01-17 收稿, 2005-02-17 收修改稿)