



翻译后修饰对于蛋白质结构动态与稳定性的影响 ——实验和理论的探索

李煜昊¹, 陈海龙², 唐淳^{1*}

1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

2. 中国科学院物理研究所, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: Tang_Chun@pku.edu.cn

收稿日期: 2025-01-25; 接受日期: 2025-03-09; 网络版发表日期: 2025-03-17

国家自然科学基金重大项目(编号: 92353304)资助项目

摘要 翻译后修饰(PTMs)在调控蛋白质结构动态、稳定性及功能方面发挥着关键作用。常见的修饰类型如磷酸化、糖基化、乙酰化和泛素化等, 通过共价修饰改变蛋白质的局部结构、静电相互作用、疏水性及氢键网络, 进而调控蛋白质的稳定性及其在细胞内的降解速率。不同PTMs之间通过协同作用或顺序修饰进一步增加了蛋白质功能调控的复杂性。为深入研究PTMs的影响, 研究者已开发并应用多种实验技术, 包括红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)和氘交换质谱(HDX-MS)等, 这些方法能够从不同分辨率水平揭示PTMs诱导的蛋白质构象和动态变化, 表征PTMs引起的局部结构扰动, 还能揭示别构效应及低丰度激发态构象对蛋白质稳定性的影响, 以及PTMs对蛋白质的去折叠和聚集过程的影响。在生物医药应用中, PTMs通过实现靶向递送和降低免疫原性来增强治疗性蛋白质的性能, 从而提高药物的疗效和安全性。总之, 通过深入研究PTMs的分子机制, 结合多学科技术手段进行整合表征, 将为设计和开发更高效、更稳定的蛋白质药物及治疗策略提供重要理论依据和技术支持。

关键词 蛋白质, 翻译后修饰, 结构动态, 热力学耦合, 谱学方法

1 引言

翻译后修饰(post-translational modification, PTM)会影响蛋白质的结构动态、稳定性和功能。翻译后修饰是指对蛋白质的主链或侧链共价连接额外的官能团或蛋白质, 常见的翻译后修饰类型包括磷酸化、糖基化、泛素化、甲基化、乙酰化等。翻译后修饰一般由特定的酶催化完成。蛋白质有高度动态性, 进而在特定条件下执行特定的功能, 而翻译后修饰是调控蛋

白质动态变化的核心机制之一, 在特定的时间和空间动态地“写入”或“擦除”翻译后修饰。这种修饰可以发生在蛋白质“生命周期”的任何阶段。例如, 许多蛋白质在翻译完成后立即被修饰, 以保证蛋白的正确折叠、提高蛋白稳定性, 或引导新生蛋白质定向到特定的细胞器。有些修饰则在蛋白质完成折叠和定位后发生, 用于激活或抑制其活性, 调控其生物学功能。除了单一的修饰位点和修饰类型外, 蛋白质还可能经历多种翻译后修饰的组合作用, 例如翻译后切割与功能基

引用格式: Li Y, Chen H, Tang C. How post-translational modifications impact protein dynamics and stability—experimental and theoretical investigations. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 937–948, doi: [10.1360/SSC-2025-0016](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0016)

团添加的协同作用, 这些修饰共同参与蛋白质的成熟激活过程.

翻译后修饰的引入会影响蛋白质的结构动态与稳定性, 而这两者往往是密切关联的. 蛋白质的稳定性不仅体现在其物理化学性质上, 如蛋白质在特定变性剂浓度或温度下发生去折叠, 也包括其在细胞环境中的降解清除的快慢, 因此涉及与其他分子(如蛋白酶或结合蛋白)的相互作用. 翻译后修饰可能通过多种机制影响蛋白质的物理稳定性: 例如, 糖基化可以通过引入大体积的亲水基团增强蛋白质的热稳定性, 防止其变性并促进正确折叠; 磷酸化和乙酰化等修饰则通过改变蛋白质的静电相互作用, 调控其结构动态和聚集倾向; 而泛素化则通过标记蛋白质以被蛋白酶体降解, 直接影响其在细胞中的稳定性. 此外, 翻译后修饰还可以通过改变蛋白质的疏水性(如脂化修饰)或保护其免受蛋白水解酶的破坏, 进一步调控蛋白质的功能和寿命.

本综述重点关注翻译后修饰如何通过改变蛋白质的结构动态来影响稳定性, 及核磁共振(NMR)和红外光谱(IR)等谱学技术如何对蛋白质结构动态与稳定性的改变进行表征. 理解翻译后修饰对蛋白质动态结构与稳定性的调控机制, 不仅有助于揭示蛋白质功能的分子基础, 更好地理解蛋白质的功能多样性, 还为开发半衰期长的稳定蛋白质药物和治疗策略提供了重要依据.

2 翻译后修饰对于蛋白质稳定性的影响

目前已经发现有200多种蛋白质的翻译后修饰, 这里仅聚焦于磷酸化、糖基化、乙酰化、泛素化这几种常见的也研究得比较透彻的翻译后修饰(图1). 在分别讨论每一种翻译后修饰如何影响蛋白质结构稳定性的基础上, 将进一步讨论翻译后修饰如何通过影响蛋白质的结构动态来影响蛋白质稳定性.

2.1 磷酸化修饰

在真核细胞中, 磷酸化修饰主要发生在丝氨酸和苏氨酸残基的侧链羟基上. 作为蛋白质翻译后修饰中丰度最高的一种修饰类型, 丝氨酸/苏氨酸磷酸化在细胞中发挥了重要的生物学功能^[1]. 磷酸化对蛋白质结构稳定性的影响具有显著的位点特异性. 研究表明, 特定位点的磷酸化可以稳定蛋白质的局部或整体结

构^[2-4], 这种效应还可以通过别构效应实现, 即磷酸化在稳定修饰位点附近结构的同时, 使远端结构变得更加暴露^[5]. 支持这一理论的研究发现, 位于结构紧凑或有结构的区域(如 β -折叠片和 α -螺旋)的磷酸化通常会降低蛋白质的热稳定性, 而位于柔性暴露区域的磷酸化则可能增强热稳定性^[6].

由于磷酸基团携带两个负电荷, 磷酸化会显著改变修饰位点附近的电荷分布. 因此, 磷酸化对蛋白质稳定性的影响被认为主要是焓效应驱动的, 即磷酸氧与邻近的正电荷氨基酸侧链或蛋白质主链形成氢键或盐桥^[7,8]. 例如, McKnight课题组^[2]对磷酸化成束蛋白C端headpiece结构域的研究发现, 模拟磷酸化的S74E突变引入的谷氨酸可以与N端24位赖氨酸形成额外的盐桥, 从而拉近C端与N端的距离并使N端柔性环区域变得更加刚性. 类似地, Kar课题组^[4]对WNK1激酶的研究表明, 磷酸化通过静电作用将G268与R264之间的盐桥转变为G268与R348之间的盐桥, 从而稳定柔性环结构. 此外, 位于 α 螺旋上的磷酸基团还能与螺旋的电偶极矩发生中和, 进一步改变蛋白质的电荷分布^[9].

磷酸化对蛋白质稳定性的影响不仅限于稳态折叠结构, 还涉及对折叠中间态或激发态的调控. 例如, 泛素S65位点的磷酸化会使其热变性温度降低 $\sim 15^{\circ}\text{C}$, 并诱导泛素形成一种新的“收缩态”构象, 与原有的“舒展态”构象比较, 大概占40%^[10,11]. 在收缩态构象中, 与S65相邻的 β 折叠片段向上移动两个氨基酸, 形成新的氢键网络. Tang课题组^[12]发现, 靠近S65的疏水氨基酸(如L67和L69)突变为丙氨酸会显著降低蛋白质的热稳定性, 并促进舒展态向收缩态的转变; 而远离S65、靠近C末端的疏水氨基酸(如L71和L73)突变则会提高热稳定性并抑制收缩态的形成. 这表明蛋白质在毫秒尺度的动态变化与其热稳定性密切相关, 磷酸化的影响不能仅从稳态结构的热力学耦合度考量.

此外, 磷酸化还能诱导蛋白质无序区域(IDR)或固有无序蛋白(IDP)从无序向有序转变. 例如, Zweckstetter课题组^[13]发现, 多磷酸化可以显著改变富含精氨酸-丝氨酸重复序列的低复杂度区域的构象系综, 使其从柔性状态转变为刚性结构. 同一课题组^[14]对固有无序蛋白4E-BP2的研究进一步表明, T37和T46位点的磷酸化介导了该蛋白从无序状态向具有 β -折叠片的有序结构的转变. 这种结构变化导致K57位点被包埋, 从而避免了泛素化介导的降解, 显著提高了4E-BP2在细胞中

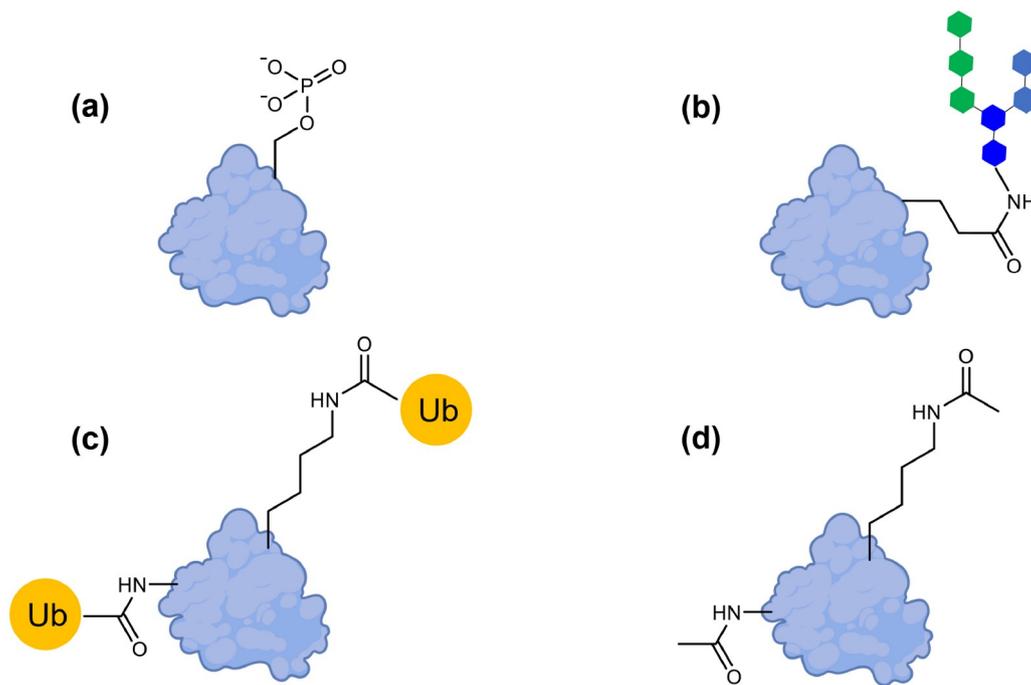


图 1 (网络版彩图)翻译后修饰化学结构的示意图。(a) 磷酸化, 主要发生在丝氨酸和苏氨酸的羟基; (b) 糖基化, 以发生在谷氨酰胺残基的N-糖基化为例, 不同颜色的六边形代表不同类型的单糖单元; (c) 泛素化, 主要发生在赖氨酸残基和蛋白质N端氨基; (d) 乙酰化, 乙酰基主要修饰在赖氨酸和蛋白质N端的氨基

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of chemical structures after post-translational modifications. (a) Phosphorylation, which primarily occurs at the hydroxyl groups of serine and threonine. (b) Glycosylation, as exemplified by N-glycosylation at glutamine residues, where hexagons with different colors represent various types of monosaccharide subunits. (c) Ubiquitination, which occurs at lysine residues and the N-terminal amino groups of proteins. (d) Acetylation, where acetyl groups primarily modify lysine and the N-terminal amino groups of proteins.

的稳定性。与此相反, *IκBα*的N端约100个氨基酸的无序区域中, S32和S36位点的磷酸化会促进K21和K22位点的泛素化^[15], 进而启动*IκBα*的降解并激活NF-κB信号通路。

总之, 磷酸化修饰对蛋白质稳定性的影响具有多面性和复杂性。它不仅通过改变蛋白质的电荷分布和内部相互作用网络直接影响稳态结构的稳定性, 还能通过调控折叠中间态或激发态的构象动态, 间接影响蛋白质的热稳定性和功能。

2.2 糖基化修饰

糖基化修饰分为N-糖基化和O-糖基化, N糖基化主要发生在天冬酰胺的氨基, 主要修饰膜蛋白的细胞外区域, 而O-糖基化主要发生在丝氨酸和苏氨酸的羟基, 因此与磷酸化修饰可能竞争同一位点。糖基化会影响蛋白质的结构动态, 提高蛋白质的热稳定性^[16,17]。另一方面, 糖基化也可能使蛋白质结构变得不稳定, 具

体产生何种效应及其显著程度与修饰的位点相关^[18,19]。有意思的是, 糖基化对蛋白质结构稳定性影响的效果与第一个糖单元的关系最为显著, 而糖链长度的贡献不大^[19,20]。

糖基化对蛋白质结构稳定性的影响还可能通过调控关键去折叠中间态或激发态实现, 即改变折叠中间态的比例或改变结构态之间的转变速率, 从而影响折叠-去折叠之间的平衡^[21-23]。对于稳态结构, 研究表明糖基化可能通过形成额外的相互作用(如氢键或疏水作用)来稳定蛋白质结构, 但也可能破坏原有的相互作用导致去稳定化^[18,24,25]。糖基化还可能导致激发态的自由能升高, 从而表现为对折叠态的稳定作用。这一现象一般被认为是糖基的位阻效应所致: 一方面, 糖基化通过类似分子伴侣的构象限制作用减少未折叠态的熵, 从而升高自由能^[26]; 另一方面, 糖基的位阻迫使未折叠态采取延展构象, 破坏了残余相互作用, 表现为焓效应^[17,27]。

综上所述,糖基化对蛋白质稳定性的影响主要取决于其对蛋白质结构内部相互作用的改变,通常以焓驱动为主.在蛋白质内部特异性相互作用未显著改变的情况下,糖基化的稳定化效应则可能是激发态焓变与熵变综合作用的结果.

2.3 N端乙酰化修饰

乙酰化修饰通常发生在赖氨酸侧链或蛋白质N端,由于与泛素化修饰竞争同一位点,因此在调控蛋白质降解和功能中具有重要作用.目前,关于N端乙酰化对蛋白质稳定性的影响研究较为深入,其缺失会导致蛋白质错误折叠和聚集^[28].例如,对酵母蛋白组的热稳定性分析发现,N端乙酰化缺失会显著降低核糖体相关蛋白的热稳定性,加速这些蛋白的降解和代谢周转^[29].

除了影响蛋白质的折叠稳定性,N端乙酰化还能调控固有无序蛋白的结构动态.研究表明,N端乙酰化可以增强无序蛋白的螺旋倾向,尤其是在其与膜结合的情况下.例如,N端乙酰化能够抑制 α -突触核蛋白的聚集,这与其稳定N端螺旋结构有关^[30,31].N端乙酰化诱导 α -螺旋形成的机制,可能是由于乙酰基团与 α -螺旋电荷偶极矩的相互作用.N端乙酰化同样会促进廷顿蛋白的N端螺旋的形成,但在亨廷顿蛋白的聚集过程中,N端乙酰化反而起到了促进作用^[32].

2.4 泛素化修饰

泛素化是介导蛋白质进入泛素-蛋白酶体系统(UPS)降解的关键翻译后修饰.在这一过程中,由76个氨基酸组成的泛素分子通过共价连接到底物蛋白的赖氨酸残基或N端氨基,将底物标记并输送到蛋白酶体进行降解.蛋白酶体对底物的降解需要底物暴露一段约30个氨基酸的无序肽段,称为降解子(degron),以启动降解过程^[33].然而,许多缺乏此类无序区的蛋白质仍可被UPS有效降解^[34,35],因此这一现象促使研究者进一步探索泛素修饰对底物蛋白结构的影响.

早期研究主要通过分子动力学(MD)模拟方法,揭示了泛素及不同类型泛素链对底物稳定性的影响.研究发现,连接在特定位点的泛素和泛素链会降低底物蛋白的热稳定性,其中K48泛素链比K63泛素链具有更显著的去稳定化效果,这与K48泛素链介导蛋白质降解的功能一致^[36,37].Shirakawa课题组^[38]对多聚泛素的

研究进一步发现,泛素链的形成会降低泛素自身的热稳定性并促进其聚集,这种现象在不同类型的泛素链中普遍存在.此外,融合表达在其他蛋白N端的泛素也会降低该蛋白的热稳定性.基于这些发现,该课题组^[39]利用二硫键模拟异肽键连接,系统研究了泛素对底物稳定性的影响,发现泛素化会降低底物的热稳定性和对盐酸胍的抗性,且这种去稳定化作用的程度与修饰位点附近的二级结构及泛素链长度密切相关.

为了进一步探索泛素化修饰对蛋白稳定性的影响,Marqusee课题组^[40]构建了真正异肽键连接的泛素-底物系统.他们发现,泛素对底物稳定性的影响具有位点依赖性:修饰在“敏感”位点的泛素会显著降低底物在尿素中的稳定性,并增加底物被蛋白酶水解的速率,甚至促进不依赖于泛素的蛋白酶体降解.这些结果表明,泛素修饰能够辅助底物的去折叠过程.此外,研究还发现,泛素修饰足以使缺乏无序区的底物暴露出足够启动蛋白酶体降解的无序肽段,进一步证明泛素修饰会显著改变底物蛋白的能量景观并降低其稳定性.

泛素修饰对底物蛋白的稳定性和结构动态的影响,首先是一种熵驱动过程.这主要基于以下证据:(1)泛素与底物之间的相互作用主要是非特异性的,且相互作用界面小于典型的蛋白复合物;(2)泛素化修饰会导致底物结构变得更加松散,同时降低残基的动态性,表明泛素引入的折叠熵补偿了构象熵的损失;(3)多聚泛素比单泛素具有更强的去稳定化效果,这提示多聚泛素体积更大,对底物蛋白施加了更多的空间限制,从而进一步降低了构象熵^[36,37,39].Marqusee课题组^[41]还通过HSQC核磁实验和氘气交换质谱(HDX-MS)结合MD模拟,进一步揭示了泛素修饰影响底物稳定性的复杂机制.他们发现,泛素连接在“敏感”位点时会产生别构效应,导致与修饰位点相距较远的区域变得更加暴露.此外,修饰在底物不同位点的泛素作用机制存在差异:某些位点通过限制底物的特定构象引入熵惩罚,而其他位点则直接破坏 β -折叠片等二级结构,表现为焓效应.总之,泛素化修饰不仅作为蛋白质降解的信号标记,还通过改变底物蛋白的结构动态和能量景观影响蛋白的稳定性.

2.5 翻译后修饰通过调控蛋白质的结构与动态特性,进而影响其稳定性

综上所述,翻译后修饰通过改变蛋白质局部的静

电和疏水相互作用, 显著影响其局部结构. 这些局部变化不仅限于修饰位点附近, 还可能通过长程的别构效应改变蛋白质其他区域的溶剂暴露程度和动态特性. 例如, 磷酸化通过引入负电荷改变静电相互作用, 而乙酰化则通过中和电荷或增加疏水性影响蛋白质的构象动态.

蛋白质的结构动态与其稳定性(包括热稳定性和化学稳定性)密切相关, 并进一步影响蛋白在细胞中的降解速率. 翻译后修饰对蛋白质稳定性的影响不仅体现在焓效应(如氢键、盐桥的形成或破坏), 还涉及熵效应(如构象熵的变化). 更重要的是, 翻译后修饰的影响可能并非直接作用于蛋白质的稳态结构, 而是通过调控部分去折叠的亚稳态或激发态结构来实现. 例如, 磷酸化修饰通过改变激发态的结构动态, 来调控蛋白质的热稳定性.

还需要指出的是, 翻译后修饰之间并非孤立存在, 一种修饰的完成可能促进另一种修饰的发生. 例如, 乙酰化和泛素化竞争赖氨酸位点, 而磷酸化可能为其他修饰(如泛素化)提供识别信号. 这种修饰间的协同作用进一步增加了蛋白质功能调控的复杂性(图2).

最后, 蛋白质的稳定性与其聚集行为密切相关, 翻译后修饰通过改变蛋白质的局部结构和动态特性, 不仅影响其折叠稳定性, 还可能调控其聚集倾向. 例如, 糖基化通过增强蛋白质的局部刚性抑制聚集, 而某些乙酰化修饰则可能促进蛋白质的聚集. 因此, 表征理解翻译后修饰对蛋白质稳定性和聚集行为的综合影响, 对于揭示蛋白质功能调控的分子机制具有重要意义.

3 表征翻译后修饰对于蛋白质稳定性影响的实验技术

有多种实验方法可用于表征翻译后修饰对蛋白质结构、动态性及稳定性的影响. 其中, 内源的色氨酸荧光和外加的8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)荧光的变化常用于评估蛋白质的去折叠状态. 色氨酸的吲哚环和ANS的荧光强度与疏水环境密切相关, 因此, 其荧光变化可以反映蛋白质构象的动态变化. 此外, 圆二色谱(CD)通过监测升温或加入变性剂后谱图的变化, 能够有效评估蛋白质的稳定性. 然而, 为了获得更全面的蛋白质结构和动态特性信息, IR、质谱(MS)和NMR等技术

不仅能够揭示翻译后修饰对蛋白质局部结构的影响, 还能捕捉长程别构效应和动态变化. 以下详细讨论了这些实验技术在表征翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性影响中的应用.

3.1 红外光谱在表征翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性影响中的应用

某些翻译后修饰在红外光谱中产生独特的吸收峰, 使得IR能够直接定量分析蛋白质修饰. 例如, 糖基化蛋白在950~1200 cm^{-1} 区域显示出糖基特有的吸收峰, 这些峰源于糖环的复合振动模式, 具有高度特异性, 可用于区分不同的糖基类型及其连接方式. 通过同位素标记和差分光谱技术, 研究者能够更精准地分离修饰对光谱的贡献. 例如, Khajehpour等^[42]通过IR分析多种糖基化蛋白(如黏蛋白、胶原IV等), 发现其在1000~1200 cm^{-1} 区间表现出显著吸收峰, 且吸收强度与糖基化程度呈正相关. Derenne等^[43]进一步利用IR区分了14种治疗性单克隆抗体的糖基化模式, 证明了IR在糖基化研究中的独特优势.

酰胺I带(1700~1600 cm^{-1})主要来源于酰胺基团的C=O伸缩振动, 其频率由氢键网络和二级结构决定, 因此可用于定量分析蛋白质的二级结构. 在D₂O溶液中, α -螺旋的吸收峰位于1658~1650 cm^{-1} , β -折叠位于1640~1620 cm^{-1} 和1695~1690 cm^{-1} , 而 β -转角和无规则卷曲则分别位于1663~1694 cm^{-1} 和1640~1648 cm^{-1} ^[44]. 酰胺II带和酰胺III带在蛋白质结构表征中同样具有重要作用. 酰胺II带主要来源于N-H弯曲振动和C-N伸缩振动, 对氢键网络和溶剂环境高度敏感, 因此可用于评估蛋白质的二级结构、稳定性及其与配体的相互作用. 酰胺III带则因其对局部环境变化的高敏感性, 被广泛用于研究蛋白质的构象特性和修饰效应. 结合其他光谱区域的分析结果, 酰胺II/III带能够揭示蛋白质在不同环境和修饰条件下的动态变化.

Natalello等^[45]利用红外光谱表征了CRL1 (Candida rugosa lipase 1)蛋白, 发现900~1200 cm^{-1} 区间存在碳水化合物特征带, 而PNGase F酶切除糖基后, 该特征带强度显著下降, 证实了糖基化修饰的存在. 而在CRL1的热稳定性的表征中, 发现20~100°C范围内酰胺I和II带有明显变化, 并且在64°C (H₂O中)和70°C (D₂O中)时发生显著的 α -螺旋和 β -折叠丧失, 并伴随聚集结构的形成. Ardahanli等^[46]利用红外光谱结合化学

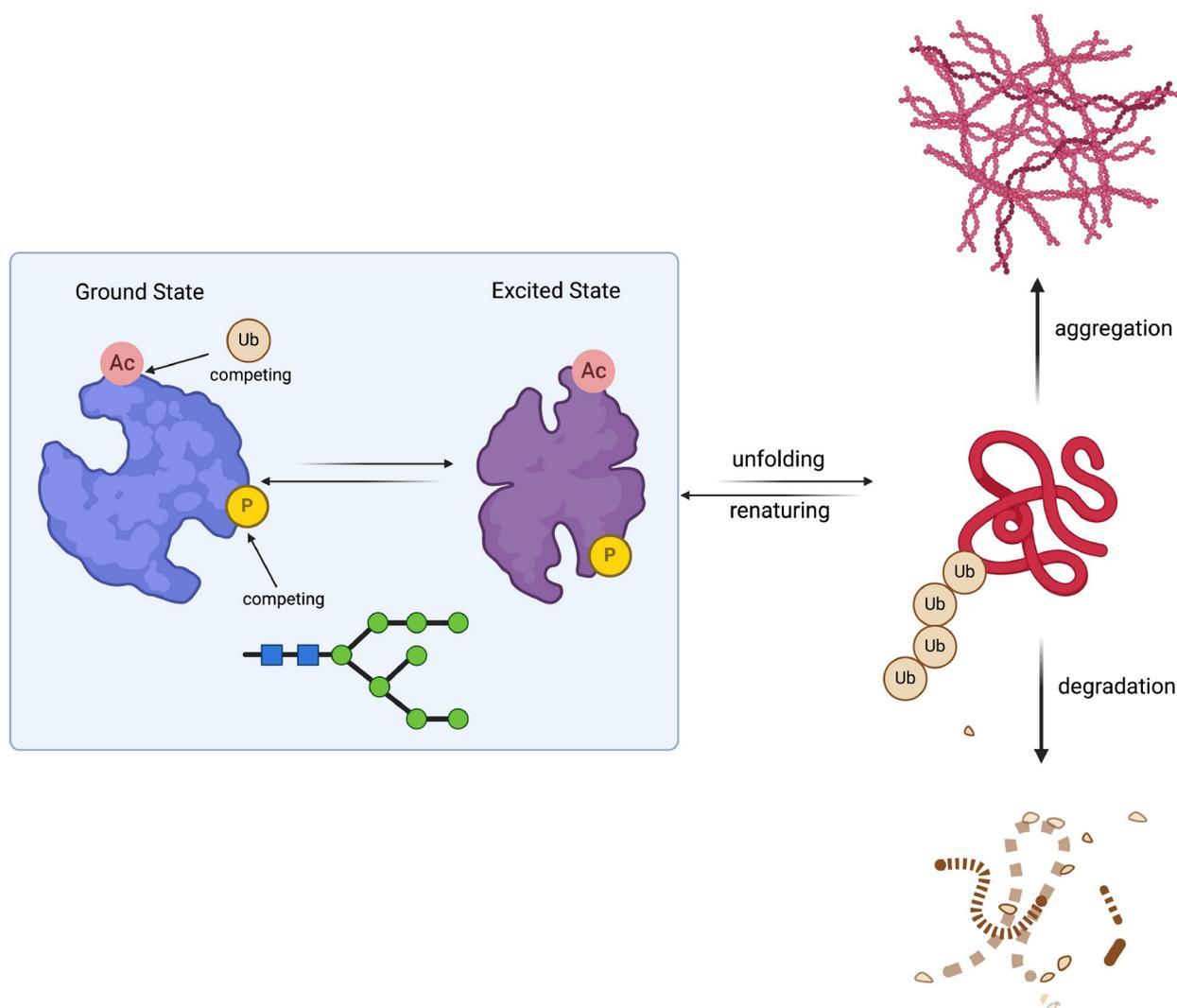


图 2 (网络版彩图)蛋白质的翻译后修饰(PTM)与蛋白质的动态结构密切相关。一方面磷酸化(用P表示)可以调控蛋白质在不同结构、活性状态之间的转变,一方面泛素化(用Ub表示)可以调控蛋白质的稳定性和易降解性。此外,PTM如乙酰化(用Ac表示)可以与泛素化竞争同一修饰位点,糖基化可以与磷酸化竞争同一修饰位点。不同类型不同位点的修饰交错进行互相影响,协同作用,进一步增加了蛋白质功能调控的复杂性

Figure 2 (Color online) Post-translational modification (PTM) of proteins and its close relationship with dynamic structures of proteins. On one hand, phosphorylation (denoted as P) regulates transitions between different structures and activity states of proteins, while ubiquitination (denoted as Ub) modulates the stability and degradability of proteins. Additionally, PTM such as acetylation (denoted as Ac) may compete with ubiquitination for the same modification sites, and glycosylation may compete with phosphorylation for the same modification sites. The intricate interplay of diverse modifications at distinct sites—through mutual influence and synergistic effects—further amplifies the complexity of functional regulation in proteins.

计量学方法,研究了间歇性禁食对大鼠心肌蛋白质修饰的影响。他们发现,禁食显著提高了蛋白质磷酸化水平(增加62%)和蛋白质总量(增加35%),而蛋白质氧化(羰基化)水平下降了38%,表明磷酸化修饰在心肌细胞信号传递和功能恢复中起关键作用。Tombolesi等^[47]结合红外光谱和拉曼光谱,研究了高盐诱导的高

血压大鼠模型中HFpEF早期的心肌蛋白质修饰和二级结构变化。红外光谱显示,酰胺I带和II带的光谱强度在高血压模型中显著增强,表明蛋白质总量增加;1396 cm^{-1} 处的信号增强则提示游离氨基酸增多,可能与高血压诱导的代谢变化相关。拉曼光谱进一步揭示了酰胺III带强度增加,提示心肌胶原蛋白沉积升高,

尤其在右心室和右心房显著. 此外, $830/860\text{ cm}^{-1}$ 的光谱比值升高反映了酪氨酸修饰(如磷酸化或甲基化)程度增加, 并与纤维化水平呈正相关. 这些研究展示了IR技术在解析蛋白质修饰与疾病机制关联中的强大能力.

3.2 核磁共振在表征翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性影响中的应用

核磁共振(NMR)技术为研究溶液中生物大分子的结构和动态特性提供了原子级分辨率的信息. 与晶体学不同, 溶液NMR能够更真实地反映生物分子在溶液中的构象系综和动态行为, 并捕捉不同时间尺度的动态过程及中间态, 因此成为研究蛋白质稳定性和解折叠过程的最精细技术手段之一(图3). 在对蛋白质翻译后修饰的研究中, NMR通过化学位移变化和谱学分析, 为揭示修饰对蛋白质结构和稳定性的影响提供了独特视角.

化学位移是NMR提供的最直接且易于获取的信息. 例如, 磷酸化修饰可以通过 ^{31}P NMR谱中特征峰的出现直接检测^[11]. 此外, ^{19}F NMR因其高灵敏度和蛋白质中天然缺乏氟元素的特性, 成为研究蛋白质稳定性的有力工具. ^{19}F 标记的蛋白质在结构变化时, 其化学环境改变会直接反映在 ^{19}F 化学位移的变化上, 从而提供高信噪比的一维谱^[48]. 更重要的是, ^{19}F NMR信号不受生物体内常见自旋核(如 ^1H)的干扰, 因此被广泛应用于复杂生理环境甚至活细胞中, 实时监测蛋白质翻译后修饰过程及翻译后对修饰蛋白质结构动态和稳定

性的影响^[49-51].

二维NMR实验, 如异核单量子相干谱(HSQC)和异核多量子相干谱(HMQC), 通过 ^1H 与 ^{15}N 或 ^{13}C 的化学位移交叉峰, 显著提高了对蛋白质残基的分辨率. 次级化学位移(即由二级结构引起的残基化学位移差异)能够揭示残基所处区域的二级结构和无序程度, 从而通过化学位移变化研究蛋白质的解折叠过程^[52]. 例如, 无序蛋白或无序区域由于缺乏二级结构, 其化学位移分布区间较窄, 因此通过分析化学位移分布, 可以快速评估蛋白质的折叠状态^[14].

变温HSQC实验通过监测谱峰位置随温度的变化, 能够揭示蛋白质热变性过程中的结构动态. 化学位移随温度的变化与氢键的存在和强度密切相关: 氢键的断裂或结构改变可能导致化学位移的非线性变化^[53]. 因此, 通过分析各残基化学位移随温度的变化, 可以评估蛋白质局部结构的稳定性, 并探究折叠和解折叠过程中氢键的形成与断裂, 进而揭示去折叠中间态的性质^[54].

此外, NMR还为研究蛋白质的结构动态提供了独特的多时间尺度分析能力. 其中, ^{15}N 的 R_1 、 R_2 弛豫速率测定以及 ^1H - ^{15}N 异核NOE (hnNOE)测定, 能够反映与分子整体转动速率相当或更快时间尺度(ps-ns)的运动. 翻译后修饰后弛豫参数的改变往往反映了蛋白质二级结构的变化. 例如, 折叠蛋白中某一区域的横向弛豫速率 R_2 值的降低或hnNOE值的下降通常表明该区域的二级结构消失并转变为无序状态, 反之则可能提示无序区域向有序结构的转变^[13,30]. 弛豫色散(RD)实

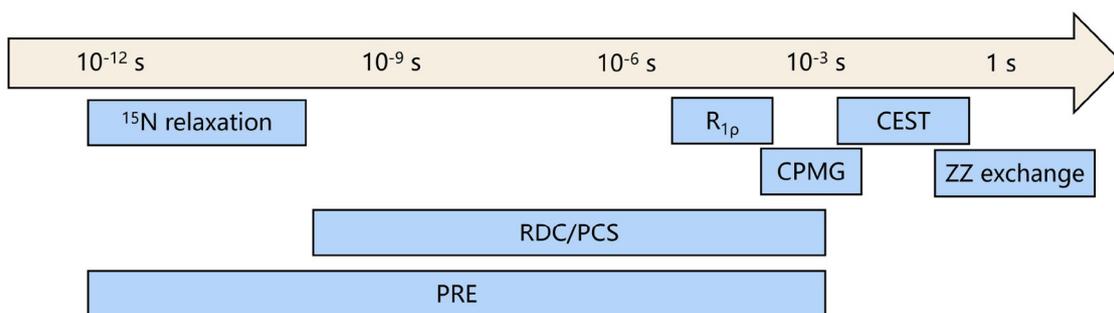


图3 (网络版彩图)表征不同时间尺度蛋白质动态性质的核磁实验, 包括文章中详细介绍的 ^{15}N 弛豫实验、弛豫色散(RD)实验、饱和弛豫交换实验(CEST)以及其他实验如残余偶极耦合(RDC)、赝接触化学位移(PCS)、顺磁弛豫增强(PRE)和ZZ交换实验

Figure 3 (Color online) NMR experiments characterizing the dynamic properties of proteins across different time scales, including those detailed in the article: ^{15}N relaxation, relaxation dispersion (RD), chemical exchange saturation transfer (CEST), as well as other methodologies such as residual dipolar coupling (RDC), pseudocontact chemical shift (PCS), paramagnetic relaxation enhancement (PRE), and ZZ-exchange experiments.

验主要包括CPMG和 $R_{1\rho}$ 实验, 通过化学交换过程中磁矢量分散导致的弛豫率增加, 研究蛋白质在 μs - ms 时间尺度的构象动态. 通过施加不同强度的脉冲对磁矢量进行重聚, 并测量有效弛豫速率与脉冲强度的关系, RD实验能够揭示低丰度的结构状态信息, 从而为蛋白质折叠和去折叠过程的研究提供关键数据. 例如, 在对Fyn SH3突变体解折叠过程的研究中, CPMG实验成功捕捉到了折叠中间态的存在, 而这一中间态无法被停流荧光实验捕获到^[55]. 饱和弛豫交换(CEST)实验则适合于表征在 ms - s 时间尺度的结构动态. 例如, CEST实验成功捕获了未修饰的泛素蛋白也存在收缩态结构, 而磷酸化会促进向这一结构状态的转变^[56]. 最近的研究进一步将CEST实验应用于突变导致的泛素稳定性的变化, 阐明了热稳定性与 ms 时间尺度的结构动态的关联^[12].

总之, NMR技术通过化学位移变化、二维谱学分析以及变温实验, 从 ps 一直到 s 的多时间尺度揭示翻译后修饰对蛋白质结构动态的影响. 这些方法不仅能够捕捉翻译后修饰引起的局部构象变化, 还能揭示长程别构效应和高能态物种的动态行为, 为理解翻译后修饰在蛋白质功能调控中的作用机制提供了重要工具.

3.3 质谱在表征翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性影响中的应用

对于提纯蛋白, HDX-MS是一种基于蛋白质主链酰胺与溶剂中氘代质子交换的技术. 尽管其分辨率通常无法达到单个残基水平, 但由于其样品需求量少、对样品稳定性要求低等优势, HDX-MS已被广泛应用于研究蛋白质构象变化、结构动态性及蛋白质间相互作用. HDX的基本原理是将蛋白质稀释到氘代溶剂中, 通过监测质量增加来反映不同位点残基的氢氘交换速率差异. 由于主链酰胺的氢键构成了二级结构的骨架, 其HDX速率能够提供蛋白质结构和动态的关键信息, 表征特定残基质子的包埋程度和氢键网络, 这些性质与蛋白质的二级和三级结构密切相关^[57,58].

HDX-MS方法主要包括连续HDX和脉冲HDX. 连续HDX通过将蛋白质稀释到氘代溶剂中, 监测肽段质量随着时间的变化来反映HDX速率, 从而揭示蛋白质的结构和动态信息. 脉冲HDX则用于研究折叠中间态, 通常将变性蛋白质置于折叠环境中, 在特定时间点短暂暴露于氘代溶剂中进行交换, 随后淬灭反应并进行

质谱检测. 通过调节折叠和氘代暴露的时间间隔, 可以获取蛋白质折叠动力学的信息. 这种方法通常在高 pD ($\text{pD} = 8\sim 10$)条件下进行, 以确保快速交换, 并通过酸化($\text{pD} = 2.5$)或电喷雾电离(ESI)溶剂蒸发淬灭反应^[57,59]. HDX-MS已被广泛应用于研究翻译后修饰对蛋白质稳定性的影响, 能够在肽段水平评估翻译后修饰所导致的结构动态变化^[23,41,60].

基于质谱的蛋白质组学技术在近年来取得了长足的进展, 广泛应用于蛋白质功能探索、相互作用分析等领域. 2014年, 基于质谱的蛋白质组热稳定性分析方法首次被提出, 通过药物分子结合导致的蛋白质熔点升高来表征抗癌药物的作用靶点^[61]. 该方法通常包括以下步骤: 对细胞进行短暂热处理以诱导不稳定蛋白的变性聚集, 通过离心收集可溶蛋白组分并进行酶切消化, 最后使用串联质量标签(TMT)等定量质谱技术分析肽段, 从而通过剩余可溶蛋白量表征蛋白质的变性温度^[61]. 目前, 该方法已被用于研究磷酸化、乙酰化和甲基化等翻译后修饰对蛋白质组热稳定性的影响, 揭示了热稳定性变化与蛋白质功能之间的联系^[6,29,62,63]. 总之, HDX-MS和基于质谱的蛋白质组热稳定性分析为研究翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性的影响提供了强大的工具, 为深入理解PTMs在蛋白质功能调控中的作用机制提供了重要技术支持.

3.4 翻译后修饰对蛋白质稳定性和结构动态影响的其他表征技术

除上述实验技术手段外, 多种结构生物学方法也可用于表征PTMs对蛋白质稳定性和结构动态的影响. X射线晶体学可通过分析B因子的一致性, 推断蛋白质的结构动态和稳定性信息^[64]. 近年来, 室温晶体学的发展进一步拓展了晶体学在蛋白质结构动态和稳定性变化分析中的应用范围^[65,66]. 冷冻电镜技术(Cryo-EM)在蛋白质结构研究中方兴未艾. 单颗粒冷冻电镜不仅可对纯化的蛋白质及其复合物进行分析, 还能发现和鉴定蛋白质上的PTMs, 尤其是糖基化修饰^[67]. 此外, 冷冻电镜适用于大分子蛋白质复合物的分析, 可用于比较PTMs对复合物组成动态和稳定性的影响, 特别适合研究PTMs导致的淀粉样蛋白 β 片层堆积的改变^[68,69].

单分子技术的发展为蛋白质结构动态研究提供了新的工具. 基于光信号的单分子荧光共振能量转移(smFRET)技术通过监测两个荧光分子间的能量传递

效率,可反映标记位点间的距离变化,从而揭示生物大分子的构象信息^[70]。由于蛋白质解折叠过程会导致构象松散,smFRET技术可通过能量传递效率的变化研究蛋白质稳定性^[71]。然而,单分子荧光技术需要在目标蛋白上标记至少两个荧光探针,较大的荧光基团可能影响蛋白质的结构动态。另一方面,单分子力谱技术,包括原子力显微镜(AFM)和光镊技术,已广泛应用于蛋白质折叠/去折叠过程的研究,从力学性质角度研究PTMs发生后蛋白质的稳定性和能量景观的改变^[72,73]。总之,这些技术的综合应用为全面表征翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性的影响提供了有力工具。

4 总结与展望

翻译后修饰在调控蛋白质稳定性和功能中起着关键作用。通过改变蛋白质的局部结构、动态特性及其与其他分子的相互作用,翻译后修饰能够显著影响蛋白质的热稳定性、化学稳定性以及降解速率。理解这些修饰如何影响蛋白质的特性,以及不同位点不同类型的修饰的时序和协同性,不仅有助于揭示蛋白质功能调控的分子机制,还为设计和开发更有效、更稳定的蛋白质药物和治疗剂提供了重要依据。

为了全面评估翻译后修饰对蛋白质结构动态和稳定性的影响,需要综合运用多种技术手段。IR对于二级结构的变化十分敏感,可以准确反映修饰导致的蛋白质二级结构的产生和消失;而NMR能够提供原子级分辨率的局部结构信息,揭示修饰对蛋白质构象的直接影响;HDX-MS则可以捕捉蛋白质的动态特性和构象

变化,特别适合研究折叠中间态和去折叠过程;基于质谱的蛋白质组热稳定性分析则从全局角度评估翻译后修饰对蛋白质组稳定性的影响,揭示修饰与蛋白质功能之间的联系。这些技术的联合使用,能够从多维度揭示翻译后修饰对蛋白质结构和功能的影响,为蛋白质工程和药物设计提供重要支持。

在实际应用中,翻译后修饰已被广泛用于改善蛋白质药物的性能。例如,糖基化修饰能够显著增强蛋白质的热稳定性和化学稳定性,特别是在治疗性抗体中,糖基化不仅延长了其保质期,还减少了聚集现象,从而提高了临床应用效果^[23,74]。此外,翻译后修饰还可用于实现蛋白质药物的靶向递送,例如通过添加与靶细胞表面特定受体结合的配体,增强药物的递送效率和疗效。同时,某些翻译后修饰(如糖基化或聚乙二醇化)能够降低蛋白质药物的免疫原性,使其不易引发患者的免疫反应,从而提高药物的安全性和耐受性。在蛋白质工程领域,糖基化修饰的应用尤为突出。通过糖基化修饰,工业酶在高温或极端pH条件下的稳定性显著提高,从而扩大了其应用范围^[75~78]。这种修饰不仅增强了蛋白质的热稳定性和化学稳定性,还改善了酶在不同环境中的催化活性,为工业生产和生物技术提供了重要支持。

综上所述,翻译后修饰在调控蛋白质稳定性和功能中扮演着至关重要的角色。通过深入研究这些修饰对蛋白质特性的影响,并结合多种技术手段进行综合表征,研究人员能够设计和开发更高效、更稳定的蛋白质药物和治疗策略。这不仅推动了生物物理化学、分子生物学、蛋白质工程的发展,还为疾病治疗提供了新的可能性。

参考文献

- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. *Cell*, 2006, 127: 635–648
- Jiang ZG, McKnight CJ. *Structure*, 2006, 14: 379–387
- Xin F, Radivojac P. *Bioinformatics*, 2012, 28: 2905–2913
- Jonniya NA, Sk MF, Kar P. *ACS Omega*, 2019, 4: 17404–17416
- Craveur P, Narwani TJ, Rebehmed J, de Brevern AG. *Amino Acids*, 2019, 51: 1065–1079
- Huang JX, Lee G, Cavanaugh KE, Chang JW, Gardel ML, Moellering RE. *Nat Methods*, 2019, 16: 894–901
- Suh JY, Tang C, Cai M, Clore GM. *J Mol Biol*, 2005, 353: 1129–1136
- Johnson LN. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37: 627–641
- Johnson LN, Lewis RJ. *Chem Rev*, 2001, 101: 2209–2242
- Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, Gladkova C, Pruneda JN, Michel MA, Gersch M, Johnson CM, Freund SM, Komander D. *EMBO J*, 2015, 34:

307–325

- 11 Dong X, Gong Z, Lu YB, Liu K, Qin LY, Ran ML, Zhang CL, Liu Z, Zhang WP, Tang C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 6770–6775
- 12 Hou XN, Song B, Zhao C, Chu WT, Ruan MX, Dong X, Meng LS, Gong Z, Weng YX, Zheng J, Wang J, Tang C. *JACS Au*, 2024, 4: 3310–3320
- 13 Xiang SQ, Gapsys V, Kim HY, Bessonov S, Hsiao HH, Möhlmann S, Klaukien V, Ficner R, Becker S, Urlaub H, Lüthmann R, de Groot B, Zweckstetter M. *Structure*, 2013, 21: 2162–2174
- 14 Bah A, Vernon RM, Siddiqui Z, Krzeminski M, Muhandiram R, Zhao C, Sonenberg N, Kay LE, Forman-Kay JD. *Nature*, 2015, 519: 106–109
- 15 Wu K, Kovacev J, Pan ZQ. *Mol Cell*, 2010, 37: 784–796
- 16 Shental-Bechor D, Levy Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 8256–8261
- 17 Shental-Bechor D, Levy Y. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19: 524–533
- 18 Price JL, Shental-Bechor D, Dhar A, Turner MJ, Powers ET, Gruebele M, Levy Y, Kelly JW. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 15359–15367
- 19 Chen L, Drake MR, Resch MG, Greene ER, Himmel ME, Chaffey PK, Beckham GT, Tan Z. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 7612–7617
- 20 Hanson SR, Culyba EK, Hsu TL, Wong CH, Kelly JW, Powers ET. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 3131–3136
- 21 Mitra N, Sharon N, Surolia A. *Biochemistry*, 2003, 42: 12208–12216
- 22 Chen MM, Bartlett AI, Nerenberg PS, Friel CT, Hackenberger CPR, Stultz CM, Radford SE, Imperiali B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 22528–22533
- 23 Danwen Q, Code C, Quan C, Gong BJ, Arndt J, Pepinsky B, Rand KD, Houde D. *Pharm Res*, 2016, 33: 1383–1398
- 24 Gavrilov Y, Shental-Bechor D, Greenblatt HM, Levy Y. *J Phys Chem Lett*, 2015, 6: 3572–3577
- 25 Chaffey PK, Guan X, Chen C, Ruan Y, Wang X, Tran AH, Koelsch TN, Cui Q, Feng Y, Tan Z. *Biochemistry*, 2017, 56: 2897–2906
- 26 Helenius A, Aeby M. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 1019–1049
- 27 Høiberg-Nielsen R, Westh P, Arleth L. *Biophys J*, 2009, 96: 153–161
- 28 Aksnes H, Ree R, Arnesen T. *Mol Cell*, 2019, 73: 1097–1114
- 29 Guzman UH, Aksnes H, Ree R, Krogh N, Jakobsson ME, Jensen LJ, Arnesen T, Olsen JV. *Nat Commun*, 2023, 14: 4517
- 30 Dikiy I, Eliezer D. *J Biol Chem*, 2014, 289: 3652–3665
- 31 Bartels T, Kim NC, Luth ES, Selkoe DJ, Pastore A. *PLoS ONE*, 2014, 9: e103727
- 32 Gottlieb L, Guo L, Shorter J, Marmorstein R. *J Biol Chem*, 2021, 297: 101363
- 33 Prakash S, Tian L, Ratliff KS, Lehotzky RE, Matouschek A. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 830–837
- 34 Hagai T, Azia A, Tóth-Petróczy Á, Levy Y. *J Mol Biol*, 2011, 412: 319–324
- 35 Tomita T, Matouschek A. *Protein Sci*, 2019, 28: 1222–1232
- 36 Hagai T, Levy Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 2001–2006
- 37 Gavrilov Y, Hagai T, Levy Y. *Protein Sci*, 2015, 24: 1580–1592
- 38 Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sou YS, Kageyama S, Hoshino M, Fujii T, Tsuchiya H, Saeki Y, Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Iwai K, Namba K, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M. *Nat Commun*, 2015, 6: 6116
- 39 Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sugase K, Shirakawa M. *Sci Rep*, 2016, 6: 39453
- 40 Carroll EC, Greene ER, Martin A, Marqusee S. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 866–875
- 41 Carroll EC, Latorraca NR, Lindner JM, Maguire BC, Pelton JG, Marqusee S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2025126118
- 42 Khajehpour M, Dashnau JL, Vanderkooi JM. *Anal Biochem*, 2006, 348: 40–48
- 43 Derenne A, Derfoufi KM, Cowper B, Delporte C, Goormaghtigh E. *Anal Chim Acta*, 2020, 1112: 62–71
- 44 Ye M, Zhang QL, Li H, Weng YX, Wang WC, Qiu XG. *Biophys J*, 2007, 93: 2756–2766
- 45 Natalello A, Ami D, Brocca S, Lotti M, Doglia SM. *Biochem J*, 2005, 385: 511–517
- 46 Ardahanlı İ, Özkan Hİ, Özel F, Gurbanov R, Teker HT, Ceylani T. *Biophys Chem*, 2022, 289: 106873
- 47 Tombolesi N, Altara R, da Silva GJJ, Tannous C, Zouein FA, Stensløkken KO, Morresi A, Paolantoni M, Booz GW, Cataliotti A, Sassi P. *Sci Rep*, 2022, 12: 3440
- 48 Gronenborn AM. *Structure*, 2022, 30: 6–14
- 49 Smith AE, Zhou LZ, Gorenssek AH, Senske M, Pielak GJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 1725–1730
- 50 Ye SX, Gong Z, Yang J, An YX, Liu Z, Zhao Q, Lescop E, Dong X, Tang C. *Protein Cell*, 2019, 10: 908–913
- 51 Welte H, Kovermann M. *ChemBioChem*, 2020, 21: 3575–3579

- 52 Berjanskii MV, Wishart DS. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 14970–14971
- 53 Cierpicki T, Otlewski J. *J Biomol NMR*, 2001, 21: 249–261
- 54 Trainor K, Palumbo JA, MacKenzie DWS, Meiering EM. *Protein Sci*, 2020, 29: 306–314
- 55 Korzhnev DM, Salvatella X, Vendruscolo M, Di Nardo AA, Davidson AR, Dobson CM, Kay LE. *Nature*, 2004, 430: 586–590
- 56 Gladkova C, Schubert AF, Wagstaff JL, Pruneda JN, Freund SM, Komander D. *EMBO J*, 2017, 36: 3555–3572
- 57 Konermann L, Pan J, Liu YH. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 1224–1234
- 58 Narang D, Lento C, J. Wilson D. *Biomedicines*, 2020, 8: 224
- 59 Deng Y, Zhang Z, Smith DL. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10: 675–684
- 60 Gladkova C, Maslen SL, Skehel JM, Komander D. *Nature*, 2018, 559: 410–414
- 61 Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, Werner T, Savitski MF, Eberhard D, Molina DM, Jafari R, Dovega RB, Klaeger S, Kuster B, Nordlund P, Bantscheff M, Drewes G. *Science*, 2014, 346: 1255784
- 62 Potel CM, Kurzawa N, Becher I, Typas A, Mateus A, Savitski MM. *Nat Methods*, 2021, 18: 757–759
- 63 Sayago C, Sánchez-Wandelmer J, García F, Hurtado B, Lafarga V, Prieto P, Zarzuela E, Ximénez-Embún P, Ortega S, Megías D, Fernández-Capetillo O, Malumbres M, Muñoz J. *Nat Commun*, 2023, 14: 3016
- 64 Deller MC, Kong L, Rupp B. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2016, 72: 72–95
- 65 Fraser JS, van den Bedem H, Samelson AJ, Lang PT, Holton JM, Echols N, Alber T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16247–16252
- 66 Thompson MC, Barad BA, Wolff AM, Sun Cho H, Schotte F, Schwarz DMC, Anfirrud P, Fraser JS. *Nat Chem*, 2019, 11: 1058–1066
- 67 Bai L, Li H. *FEBS J*, 2019, 286: 1638–1644
- 68 Zhao K, Lim YJ, Liu Z, Long H, Sun Y, Hu JJ, Zhao C, Tao Y, Zhang X, Li D, Li YM, Liu C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 20305–20315
- 69 Radamaker L, Karimi-Farsijani S, Andreotti G, Baur J, Neumann M, Schreiner S, Berghaus N, Motika R, Haupt C, Walther P, Schmidt V, Huhn S, Hegenbart U, Schönland SO, Wiese S, Read C, Schmidt M, Fändrich M. *Nat Commun*, 2021, 12: 6434
- 70 Lerner E, Barth A, Hendrix J, Ambrose B, Birkedal V, Blanchard SC, Börner R, Sung Chung H, Cordes T, Craggs TD, Deniz AA, Diao J, Fei J, Gonzalez RL, Gopich IV, Ha T, Hanke CA, Haran G, Hatzakis NS, Hohng S, Hong SC, Hugel T, Ingargiola A, Joo C, Kapanidis AN, Kim HD, Laurence T, Lee NK, Lee TH, Lemke EA, Margeat E, Michaelis J, Michalet X, Myong S, Nettels D, Peulen TO, Ploetz E, Razvag Y, Robb NC, Schuler B, Soleimaninejad H, Tang C, Vafabakhsh R, Lamb DC, Seidel CA, Weiss S. *eLife*, 2021, 10: e60416
- 71 Metskas LA, Rhoades E. *Annu Rev Phys Chem*, 2020, 71: 391–414
- 72 Lei R, Lee JP, Francis MB, Kumar S. *Biochemistry*, 2018, 57: 4019–4028
- 73 Ramirez MP, Rajaganapathy S, Hagerty AR, Hua C, Baxter GC, Vavra J, Gordon WR, Muretta JM, Salapaka MV, Ervasti JM. *J Biol Chem*, 2023, 299: 102847
- 74 Frenkel-Pinter M, Richman M, Belostozky A, Abu-Mokh A, Gazit E, Rahimipour S, Segal D. *Chem Eur J*, 2016, 22: 5945–5952
- 75 Mansell TJ, Guarino C, DeLisa MP. *Biotechnol J*, 2013, 8: 1445–1451
- 76 Niu C, Luo H, Shi P, Huang H, Wang Y, Yang P, Yao B, Kelly RM. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 1004–1014
- 77 Guo C, Liu Y, Yu H, Du K, Gan Y, Huang H. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26: 1163–1172
- 78 Deng B, Yue Y, Yang J, Yang M, Xing Q, Peng H, Wang F, Li M, Ma L, Zhai C. *Commun Biol*, 2023, 6: 39

How post-translational modifications impact protein dynamics and stability—experimental and theoretical investigations

Yuhao Li¹, Hailong Chen², Chun Tang^{1*}

¹ College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

² Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

*Corresponding author (email: Tang_Chun@pku.edu.cn)

Abstract: Post-translational modifications (PTMs) play crucial regulatory roles in modulating protein structural dynamics, stability, and functionality. Common modifications such as phosphorylation, glycosylation, acetylation, and ubiquitination covalently modify proteins, altering their local structures, electrostatic interactions, hydrophobicity, and hydrogen-bonding patterns. These changes influence protein stability and intracellular degradation rates. The interplay between various PTMs through synergistic or sequential modifications adds further complexity to the regulation of protein functions. To investigate PTM effects, researchers have employed a multitude of experimental techniques including infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), and hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS), which unveil PTM-induced conformational and dynamic changes at multiple resolutions. These methods can capture localized structural perturbations and allosteric effects, as well as lowly populated excited-states that impact protein stability. Moreover, it has been shown that PTMs may suppress protein unfolding and aggregation. In biopharmaceutical applications, PTMs enhance therapeutic protein performance by enabling targeted delivery and reduced immunogenicity, thereby improving drug efficacy and safety. In conclusion, in-depth investigation of the molecular mechanisms underlying PTMs, coupled with integrated characterization with multidisciplinary technical approaches, will allow researchers to design and develop better protein therapeutics and treatment strategies.

Keywords: protein, post-translational modifications, structure dynamics, thermodynamic coupling, spectroscopic methods

doi: [10.1360/SSC-2025-0016](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0016)