泛素化蛋白的化学合成及半合成

张思煜, 李方翊, 陈永湘*

生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室; 清华大学化学系, 北京 100084

*通讯作者, E-mail: chen-yx@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2013-04-15; 接受日期: 2013-05-20; 网络版发表日期: 2013-06-26

doi: 10.1360/032013-181

摘要 蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)在调节蛋白质的结构和功能上发挥着重要作用, 异常的蛋白质翻译后修饰会导致某些疾病的发生. 泛素化(ubiquitination)作为一类重要的蛋白质翻译后修饰, 已经被证明与细胞的稳态以及细胞内部的多条信号通路有关, 主要参与细胞内蛋白的定位、调节和降解以及细胞周期、基因表达、信号传递、损伤修复、炎症免疫等多种生命过程. 然而, 对于泛素蛋白的相关研究虽然进行了多年, 但是许多重要的科学问题尚未研究清楚, 其中如何高效地获得大量、均一的泛素化蛋白是最重要的挑战之一. 近年来, 蛋白质化学合成及半合成手段的发展, 很大程度上解决了这一难题. 本文主要针对目前常用的泛素化蛋白的化学合成和半合成方法进行综述.

关键词

蛋白质翻译后修饰
泛素化
化学合成和半合成

1 引言

蛋白质翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)过程主要是指在 mRNA 被翻译成蛋白质后, 蛋白质上的某些氨基酸被小分子或者蛋白质分子进行共价修饰. 这些共价修饰极大地增加了蛋白质的结构、功能和动力学多样性, 在复杂的生命活动中发挥了重要的作用^[1]. 泛素化是一类重要的蛋白质翻译后修饰, 其中泛素(ubiquitin, Ub)是具有高度保守性的小蛋白(76 个氨基酸, 图 1). 该修饰过程是在一系列连接酶(ligase) E1、E2 和 E3 的催化下, 通过泛素蛋白 C-端甘氨酸(Gly)的羧基与被修饰蛋白质上某一赖氨酸(Lys)侧链的氨基缩合形成异肽键(isopeptide bond)完成的(图 2)^[2, 3].

泛素修饰存在多样性, 泛素蛋白能以单体形式(monoubiquitin, mono-Ub)或者以不同连接方式聚合的多聚链形式(polyubiquitin, poly-Ub)与靶蛋白相连接(图 2). 多聚泛素链由多个泛素组成, 泛素单体之

图 1 单个泛素的结构以及所含的赖氨酸位点(PDB code: 1UBQ)

间通过异肽键的形成来完成一个泛素中某个特定的赖氨酸侧链与下一个泛素 C-端甘氨酸残基的连接. 泛素含有 7 个赖氨酸残基(Lys6、Lys11、Lys27、Lys29、

Lys33、Lys48、Lys63), 并且每个赖氨酸残基和 N-端甲硫氨酸残基均能用于泛素链的形成^[4]. 因而导致多聚泛素链连接方式的多样性, 以及相应功能调节的复杂性. 常见的多聚泛素链形式有 K48-连接泛素链和 K63-连接泛素链等.

泛素修饰在真核生物中普遍存在, 是细胞内的重要信号分子^[5]. 不同形式的泛素修饰调节了靶蛋白功能, 从而影响靶蛋白参与的生理过程(图 3, 表 1)^[6]. 例如, 通过第 48 位赖氨酸连接(Lys48-连接)的多聚泛素链修饰主要介导细胞内靶蛋白被多亚基蛋白酶体降解. 同时, 泛素修饰还具有其他的重要功能, 如介导膜蛋白内吞作用和蛋白质胞内运输作用、参与染色质介导的转录调节作用以及 DNA 修复等^[7-9]. 多种泛素修饰能被相应的泛素结合结构域(ubiquitin-binding domain, UBD)识别, 从而开启下游信号通路. 由于泛素修饰参与了细胞内的重要过程, 其失调与许多疾病的发生相关, 如癌症、Angelman 综合征等严重智力障碍疾病、2 型糖尿病以及帕金森氏病、阿尔茨海默病和亨廷顿氏病等神经退行性疾病等. 因此, 泛素系统如蛋白磷酸激酶一样成为了制药领域热门关注的药物设计靶标. 第一个针对泛素-蛋白酶降解体系的抗癌药物 bortezomib 于 2003 年通过了美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)的认证.

由于在传统大肠杆菌 *E.coli* 等原核表达系统中

无法表达出泛素修饰的重组蛋白, 因此, 目前研究多样化的泛素修饰对靶蛋白结构和功能的调节, 以及泛素单体或者多聚泛素链与相应泛素结合结构域之间的相互作用, 在很大程度上依赖于酶学方法在体外合成泛素修饰的蛋白质以及多聚泛素链. 然而, 利用酶法合成有以下的局限性: (1) 需要在连接酶 E1、E2 和 E3 的催化下进行一系列的酶催化反应, 产率较低; (2) 所获蛋白质产物的均一性难以控制, 导致分离纯化困难; (3) 专一性酶 E2/E3 比较难获得; (4) 所合成的以天然异肽键连接的泛素化蛋白容易被细胞裂解液中的去泛素化酶水解, 因而不适合广泛用于与细胞裂解液相关的研究^[10]. 而化学全合成以及半合成方法, 则为制备以天然异肽键或更为稳定的化学键连接的泛素修饰蛋白质以及多聚泛素链提供了新的契机. 例如, Kent 课题组^[11]发展了基于硫酯蛋白与半胱氨酸(Cys)缩合形成天然肽键而合成蛋白质的自然化学连接(native chemical ligation, NCL)方法, 通过化学合成方法合成出末端带有硫酯的蛋白质或者多肽片段, 另一个蛋白质或者多肽的末端含有半胱氨酸, 两者经过一个硫酯转移反应, 最终通过形成天然肽键而完成蛋白质的合成(图 3).

近年来, 已有报道通过化学全合成或半合成的方法成功合成了具有位点特异性的泛素修饰的多肽或者蛋白质. Muir 课题组^[12, 13]利用表达蛋白连接

图 2 蛋白质底物在酶催化作用下的泛素化过程以及多种泛素修饰形式

图 3 自然化学连接(NCL)法

表 1 不同位点的泛素修饰及其与细胞功能的关系

泛素化方式	参与调节的生理功能
单体泛素	DNA 修复、细胞内吞、组蛋白调节、病毒出芽、蛋白降解酶体系以及溶菌酶的降解调节
K63	细胞信号调节/激酶活性细胞因子、DNA 损伤修复、胞吞调节
K48	蛋白酶体降解系统调节
K33	免疫调节
K29	溶酶体降解
K27	生理功能尚不清楚
K11	细胞周期、蛋白酶降解系统、细胞信号转导
K6	生理功能尚不清楚, 目前认为可能与抑制酶体降解和 DNA 修复有关
线性的泛素蛋白链	调节影响炎症反应的 NF- κ B 因子, 参与蛋白酶降解系统调节
多聚泛素蛋白链	细胞内吞、蛋白酶体降解系统、溶酶体
混合泛素链	MHC I 的细胞内吞作用(K11/K63), 激酶的活性(K33/K29)

(expressed protein ligation, EPL)技术分别成功合成了以天然异肽键或者二硫键连接的单泛素化修饰的组蛋白 H2B. Chan 课题组^[14]利用生物表达, 采用抑制基因引发突变(suppressor mutagenesis)技术, 在靶蛋白 calmodulin 的序列中引入侧链含有非天然修饰官能团的赖氨酸残基, 然后进一步利用 NCL 方法与泛素蛋白硫酯连接, 从而制备了具有位点特异性的单泛素修饰蛋白.

总体来说, 化学合成和半合成方法相比于之前的酶法合成, 具有从原子水平上控制合成的优越性. 同时, 通过这种方法, 能够获得生物方法无法得到的一些泛素修饰蛋白类似物(如泛素与靶蛋白通过非常规的化学键连接); 而且还能够在靶蛋白的任意位点进行泛素化连接. 因此, 利用化学全合成以及半合成方法来合成单泛素化以及多泛素化蛋白成为一种新的策略. 下文将针对目前常用的一些新方法、新策略进行介绍和讨论.

2 利用化学合成和化学生物学半合成法制备泛素蛋白

2.1 泛素单体及其衍生物的化学合成

2.1.1 多肽固相合成方法

泛素蛋白是一种较小的蛋白质(共含有 76 个氨基酸), 所以可以直接通过多肽的固相合成 (solid phase peptide synthesis, SPPS)方法来合成(图 4). Ramage 等^[15, 16]利用这种方法成功合成了泛素蛋白单体. 通过这种化学全合成方法, 实现了直接在泛素蛋白序列中的任意位置插入被荧光素标记的亮氨酸(Leu)或

图 4 利用多肽固相合成泛素蛋白

者其他非天然氨基酸. 继而可以利用这些特殊标记的氨基酸, 借助圆二色谱(CD)、核磁(NMR)、X 射线(X-ray)等技术手段对其结构和构象进行分析, 并且在网织细胞中测试其与相应结合酶的相互作用, 进而测定其生物学功能^[17, 18]. 这些研究结果表明, 不同的泛素蛋白模拟物表现出与天然泛素相似的结构、构象以及生物学功能.

2.1.2 片段合成法

由于多肽的固相合成方法在应用过程中随着氨基酸数目的增加, 最终产率会逐渐降低. 因此, Ovaa 课题组^[19]通过分段的方法, 在泛素蛋白序列上寻找 6 个位点, 这 6 个位点被 4 个含假脯氨酸(pseudoproline)的二肽单元以及 2 个二甲氧苄基的二肽单元替代, 然后通过固相合成法合成线性的泛素蛋白单体(图 5(a)). 通过这种方法, 获得了在 N-端和 C-端带有多种修饰的泛素蛋白. 随着研究的进行, 在此基础上又发展了一些新的方法. 例如, 直接合成两条肽片段模拟物, 在 HCTU/DIEA (6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯/*N,N*-二异丙基乙胺)条件下进行缩合, 从而直接得到所需要的泛素蛋白. 在这一过程中, 所

图 5 片段法合成泛素蛋白. (a) 泛素序列中的 L8T9、I13T14、L56S57 和 S65T66 被假脯氨酸的二肽代替, 泛素序列中的 A46G47、D52G53 被二甲氧苄基的二肽结构单元代替, 最后直接用于多肽的固相合成进而合成所需要的泛素蛋白^[19]; (b) 利用片段法以及自然化学连接法合成泛素蛋白

获得的用于合成泛素蛋白的多肽片段也可以用于合成多聚泛素链^[20]. 伴随着一些新的多肽连接方法的产生, 片段法也有了很大发展, 其中, Kent 课题组^[21]分别以泛素蛋白第 26 位和 46 位的丙氨酸(Ala)为分界点, 将泛素蛋白分为 3 个多肽片段, 将这两个位点的丙氨酸通过化学合成方法突变成半胱氨酸, 再用 NCL 方法合成整个蛋白链, 最后经过脱硫反应, 将半胱氨酸转化成为天然的丙氨酸, 从而获得完整的天然泛素蛋白单体(图 5(b)). 利用这种方法, 该课题组合成泛素蛋白单体以及第 35 位甘氨酸突变成 D-型谷氨酰胺的泛素蛋白非对映体, 进而进行了晶体研究. X 射线分析结果显示, 引入 D-型氨基酸的泛素与天然泛素具有极其相似的构象. 这些实验结果表明, 用 D-型氨基酸替换掉泛素蛋白中的甘氨酸(如第 35 位的 Gly), 并不破坏泛素蛋白的球状折叠以及整个分子构象^[21].

2.1.3 表达蛋白连接方法

利用蛋白质自剪接技术可获得蛋白质硫酯. 硫酯不仅是 NCL 反应中的必要组件, 也是 EPL 方法中关键的活性基团. 利用重组蛋白的方法可以制备蛋白质硫酯(图 6)^[22-24]. Ploegh 课题组^[25-27]首先利用 EPL 方法获得含硫酯的泛素蛋白, 进而通过一步氨解反应, 获得 C-端带亲电基团的泛素蛋白类似物.

图 6 蛋白表达连接技术

借助这一技术的发展, 他们利用合成产物作为基于活性位点依赖的生物反应的分子探针, 进而研究参与泛素蛋白酶体途径的各个反应相关因子. 然而, 这种方法的不足在于其只能获得单体的泛素蛋白作为探针, 而且引入了一些非天然的肽键, 而这些肽键可能本身在整个生化途径中起到了很重要的识别作用.

2.2 泛素链的合成

在泛素蛋白的研究中, 化学合成以及半合成方法用于合成高纯度单一的泛素蛋白无疑是一个巨大的飞跃, 也是目前化学生物学家研究的热点. 而在合成泛素链过程中, 首先需要考虑的是如何合理地构建异肽键. 在近几年中, 基于泛素蛋白与靶蛋白形成异肽键的构建, 已经发展了很多新颖的方法^[28, 29]. 其中, Muir 课题组^[30]报道, 利用可光解的辅体介导的正交保护基团以及 EPL 方法可以成功构建 H2B 的泛素化蛋白(图 7(a)). 而 Liu 课题组以及 Brik 课题组^[31-34]分别利用赖氨酸的巯基衍生物来构建异肽键. 同时, Chin 课题组^[35]利用抑制基因表达的方法, 引入非天然的赖氨酸衍生物, 从而为构建异肽键寻找到了合适的反应位点.

在泛素链的合成领域中, Brik 课题组^[36]首先通过全合成的方法合成了所有依赖赖氨酸连接的泛素蛋白二聚体. 先用片段合成的方法将泛素拆分成两条多肽 Ub1C (Ub46-76) 和 Ub1N (Ub1-45), 此过程中 δ -巯基赖氨酸被引入到特定的位点, 而泛素的第 46 位丙氨酸则被半胱氨酸替代. 两条多肽链连接成为一个类泛素蛋白(46 位突变为半胱氨酸, 引入 δ -巯基赖氨酸), 然后与 C-端含有硫酯的泛素蛋白通过 δ -巯基赖氨酸介导进行 NCL 反应, 最后进行一步脱硫反应, 将第 46 位的半胱氨酸重新转化为天然的丙氨酸, 从而最终得到泛素蛋白二聚体(图 7(b)). 通过这种方法能够获得毫克量级的高纯度泛素蛋白二聚体. 产物通过圆二色谱进行二级结构的鉴定, 同时在活体细胞中与去泛素化结构域(DUBs) UCH-13 和 IsoT 结合, 从而判断其活性^[37, 38]. 通过上述方法, 该课题组成功获得了所有赖氨酸连接的泛素蛋白二聚体的高纯度合成产物. 同时, 通过此方法合成的泛素蛋白二聚体, 在合成过程中对其远端泛素蛋白进行 ^{15}N 标记, 最终首次成功获得了二聚体的 NMR 图谱, 进而确定其在液相中的结构; 并确定其与蛋白间相互作用的动力学特性, 进而确定其参与的细胞生命活动途径^[35, 36]. 这一结果解决了因泛素单体间较弱的相互作用而无法获得晶体结构的难题^[39-43].

为了提高底物蛋白质与末端含硫酯的泛素蛋白的结合能力, Ovaa 课题组^[19]利用酶催化的方法获得更高活性的硫酯泛素蛋白. 其依据 Brik 课题组^[33]的固相合成方法获得了固定位点带有 δ -巯基赖氨酸的

泛素蛋白, 而带有硫酯的泛素蛋白则采用 E1 酶催化的方法获得. 为了避免 E1 酶对近端泛素蛋白的影响, 将近端泛素蛋白的第 76 位甘氨酸突变为缬氨酸(Val). 这种方法随后被 Fushman 课题组^[44]发展, 进而合成了含有硫酯结构的泛素蛋白二聚体以及三聚体, 并获得了其 NMR 结构信息.

Liu 课题组^[45]利用片段法将被合成的泛素蛋白分为 3 段, 并且引入 γ -巯基赖氨酸便于其分步进行连接成整段泛素蛋白. 通过此方法, 他们成功合成了以第 48 位赖氨酸连接的泛素二聚体. 同时, Chin 课题组^[6]利用 GOPAL (利用苯甲氧羰酰琥珀酰亚胺正交保护的泛素蛋白赖氨酸侧链上的氨基进而进行缩合反应) 策略首次成功合成了 K6-和 K29-连接的泛素蛋白二聚体, 并且获得了其晶体结构.

Strieter 课题组^[46]利用巯基-双键(thiol-ene click chemistry)的光引发自由基聚合反应合成了泛素蛋白二聚体. 利用 EPL 方法在一个泛素 C-端接上含有端烯的小分子, 同时将另一个泛素的 K48 突变成半胱氨酸, 利用半胱氨酸侧链上的巯基在引发剂作用下与端烯进行加成反应, 从而获得泛素蛋白二聚体.

综上所述, 对于泛素二聚体的相关合成, 大多是为了确定其结构并探讨其不同二聚体结构所带来的不同行为表现以及与靶蛋白的相互作用. 然而, 仅仅是二聚体的泛素蛋白并不能反映泛素蛋白在自然条件下的全部构象, 如链长更长的泛素多聚体等. 因此, 得到不同长度的泛素蛋白链或其与蛋白底物结合的形式对于解决以上问题十分重要.

Brik 课题组^[47]首次报道了利用化学手段成功合成泛素蛋白的四聚体, 此蛋白复合体含有 304 个氨基酸, 是目前利用化学方法合成的最长的蛋白. 此方法中需要克服很多困难, 其中最艰难的便是如何寻找到 C-端带有硫酯的泛素蛋白二聚体, 同时还要克服因构建众多模块并最终将其一一拼接而带来的产率低的问题. 另外, 在构建模块的过程中, 新引入的 Cys46 要经过脱硫步骤获得天然的泛素蛋白, 而引入的 7 个半胱氨酸在此过程中会脱硫不完全, 因此在最后一次连接前, 需要先将每个泛素结构单元进行脱硫.

目前, 上述困难可以直接利用固相合成各种构筑单元得到解决. 例如, 适当地减少连接步骤并且同时减少半胱氨酸的引入, 从而减少脱硫的困难^[20]. 通过这种方法, Brik 课题组^[36]构建了一系列从单聚体到

图7 泛素蛋白链的合成. (a) 利用可光解的辅体介导的蛋白质合成^[30]; (b) δ -巯基赖氨酸介导的蛋白质合成^[37]

四聚体不同长度的泛素蛋白聚合物, 且获得了通过 K48 位以及 K63 位连接的不同泛素链类型. 最终通过合成这些泛素蛋白获取了与泛素相关的细胞生理功能的大量信息.

2.3 通过合成以及半合成的方法构建单泛素化蛋白

2.3.1 H2B 单泛素化蛋白的相关研究

以上介绍的利用化学生物学方法构建以自然异肽键连接的泛素多聚链及其类似物, 与构建单泛素化蛋白类似. 利用这些方法能够有效地构建具有高纯度的单泛素化蛋白, 用以探讨其生理功能. 而有趣的是, 在目前的蛋白质组学中发现, 这些单泛素化蛋白是泛素化蛋白的主要存在形式.

关于单泛素化蛋白化学合成的最早报道是关于一种组蛋白亚结构 H2B 蛋白的单泛素化, 这种蛋白质是组蛋白 4 个亚单位(H2A、H2B、H3 和 H4)中的一种. 组蛋白在真核细胞中参与构成细胞核, 其被 147 个碱基对包裹^[48], 参与多种蛋白质翻译后修饰途

径, 包括磷酸化、乙酰化、泛素化等^[49, 50]. 已发现具有翻译后修饰的组蛋白在控制染色体动力学、基因表达和 DNA 损伤修复上起到重要作用. 据目前报道, H2B 的单泛素化主要在 K120 位和 K34 位^[51], 然而还有很多问题依然难以得到合理的解答, 如 H2B 在染色体中如何发生单泛素化、泛素化修饰与组蛋白上其他翻译后修饰是否具有交叉关系、这些翻译后修饰是否与基因表达有关等. 这些研究的滞后大多与无法获得较为单一的单泛素化 H2B 蛋白有关.

Muir 课题组^[12, 52]利用半合成的方法获得了单一的单泛素化 H2B 蛋白. 在合成过程中, H2B 蛋白被分为两个片段, 即 H2B (1~116)和 H2B (117~125), 其中 H2B (117~125)片段的 K120 位赖氨酸被修饰上光敏感的基团, 其 N-端被修饰上正交保护基团的半胱氨酸残基. H2B (117~125)在光敏感的辅助中间体介导下与含有硫酯的泛素蛋白进行偶联, 获得泛素-H2B (117~125)蛋白, 其再与表达获得的 H2B (1~116)硫酯进行偶联, 最终获得全长的单泛素化 H2B (A117C)蛋白(图 8(a)). 然后经过一步脱硫过程, 将 117 位的半

图8 合成泛素化蛋白. (a) 利用光敏感的辅体介导的泛素化 H2B (A117C)蛋白的合成^[12, 52]; (b) 利用 K120 位赖氨酸引入半胱氨酸进行泛素化蛋白的合成^[53]; (c) 通过二硫键来构建自然异肽键完成泛素化蛋白的合成^[13]

胱氨酸残基还原成为丙氨酸, 从而获得高纯度的单泛素化 H2B 蛋白. 最后将此泛素化蛋白用于组装成为组蛋白八聚体, 最终证明 H3K79 位赖氨酸的甲基化需要 H2B 蛋白的泛素化, 进而说明组蛋白的多种翻译后修饰之间存在相互交错调节.

为了获得更高的合成效率, Muir 课题组^[53]又尝试了其他几种方法, 其中之一与上述蛋白表达连接法很相似, 不同的是在 H2B (118~125)中的 K120 位侧链上引入半胱氨酸, 其与 Ub (1~75)硫酯进行一次自然连接, 结果是 Ub 的第 76 位甘氨酸残基突变成丙氨酸(图 8(b)). 另一种方法是利用二硫键代替自然异肽键来构建单泛素化的 H2B 蛋白(图 8(c)), 为了获得二硫键所需要的巯基基团, 需要将 H2B 蛋白的 K120 位赖氨酸突变为半胱氨酸, 随后 K120C 的自由

巯基被 2,2'-二硫双(5-硝基吡啶)保护. 泛素蛋白则利用蛋白自剪接技术通过硫酯化转移反应获得在 C-端的自由巯基, 再进行连接反应获得以二硫键连接的单泛素化的 H2B 蛋白^[13]. 这种泛素化类似物的生物活性被相关表征手段得以证明. 通过这种方法可以获得 H2B 的第 108、116、125 位以及 H2A 的第 22 位赖氨酸单泛素化蛋白, 从而研究不同位点泛素化对蛋白质及其他翻译后修饰的影响.

2.3.2 其他单泛素化蛋白的合成方法

Zhuang 课题组^[54, 55]通过酶催化方法获得单泛素化的生长细胞的核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 并在 E1~E3 酶的作用下获得了单泛素化的 PCNA-Ub 蛋白(图 9(a, b)). 然而, 通过此方法

图9 其他泛素化蛋白的合成方法. (a) 利用酶法合成泛素化的 PCNA 蛋白^[54]; (b) 利用二硫键完成泛素化的 PCNA 蛋白的合成^[55]; (c) 利用点击化学完成泛素化 PCNA 蛋白的合成^[56]

获得的泛素化蛋白仅有毫克量级, 远远不能满足其生物化学、生物物理学及结构信息的研究. 而若要获得大量的高纯度单泛素化 PCNA 蛋白, 则最好利用上述形成二硫键的连接方法.

Marx 课题组^[56]引入点击化学(click chemistry)的概念, 将叠氮基团引入到泛素蛋白中. 叠氮基团能够与被引入到蛋白质底物中的炔基发生 Huisgen[3+2]环加成反应(copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), 完成泛素与蛋白底物的连接, 从而获得 PCNA-Ub 的蛋白类似物(图 9(c)).

3 总结

泛素化作为真核细胞内一类重要的蛋白质翻译后修饰, 对其研究具有重要的科学价值和社会意义, 近年来也引起了众多科学家的兴趣. 在泛素蛋白研

究过程中, 随着化学全合成和半合成技术手段的发展, 科学家们成功合成了大量、均一的泛素化蛋白, 包括含不同位点修饰的泛素蛋白单体、具有不同长度以及不同连接类型的多聚泛素链和泛素化蛋白. 这对于研究泛素修饰参与各种细胞生理过程有着重大的推动作用. 目前, 对于泛素蛋白的化学合成和半合成, 涉及化学和生物学的交叉和融合, 对化学生物学的发展起到一定的推动作用. 而对于泛素修饰功能的研究, 更加有利于人们了解生命过程和相关疾病的发生机制, 为寻找新的、潜在的药物靶点提供了可能.

泛素修饰研究的发展, 需要在寻找更加高效的合成方法基础上, 进一步研究泛素化对于生命活动功能的影响、泛素化和其他蛋白质翻译后修饰途径之间的联系. 我们相信, 随着化学合成和半合成方法的发展, 这一领域的研究将会取得更大的突破.

致谢 本工作得到国家自然科学基金委青年科学基金(21102082)和国家重大科学研究计划(2013CB910700)的支持, 特此一并致谢.

参考文献

- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 7342–7372
- Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503–533
- Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2001, 2: 169–178
- Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: Functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 2397–2406
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 59–180
- Virdee S, Ye Y, Nguyen DP, Komander D, Chin JW. Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 750–757
- Hay-Koren A, Caspi M, Zilberberg A, Rosin-Arbesfeld R. The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates and up-regulates beta-catenin. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 399–411
- Dynek JN, Goncharov T, Dueber EC, Fedorova AV, Izrael-Tomasevic A, Phu L, Helgason E, Fairbrother WJ, Deshayes K, Kirkpatrick DS, Vucic D. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *Embo J*, 2010, 29: 4198–4209
- Jin LY, Williamson A, Banerjee S, Philipp I, Rape M. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*, 2008, 133: 653–665
- McGinty RK, Chatterjee C, Muir TW. Semisynthesis of ubiquitylated proteins. *Method Enzymol*, 2009, 462: 25–243
- Kent SB. Total chemical synthesis of proteins. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 338–351
- McGinty RK, Kim J, Chatterjee C, Roeder RG, Muir TW. Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature*, 2008, 453: 812–816
- Chatterjee C, McGinty RK, Fierz B, Muir TW. Disulfide-directed histone ubiquitylation reveals plasticity in hDot1L activation. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 267–269
- Li X, Fekner T, Ottesen JJ, Chan MK. A pyrrollysine analogue for site-specific protein ubiquitination. *Angew Chem*. 2009, 121: 9348–9351
- Ramage R, Green J, Muir TW, Ogunjobi OM, Love S, Shaw K. Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: The total chemical synthesis of ubiquitin. *Biochem J*, 1994, 299: 151–158
- Ramage R, Green J, Ogunjobi O. Solid phase peptide synthesis of ubiquitin. *Tetrahedron Lett*, 1989, 30: 2149–2152
- Love S, Muir T, Ramage R, Shaw K, Alexeev D, Sawyer L, Kelly S, Price N, Arnold J, Mee M. Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: Synthesis and crystal structure of an analogue containing unnatural amino acids. *Biochem J*, 1997, 323: 727–734
- Alexeev D, Barlow PN, Bury SM, Charrier JD, Cooper A, Hadfield D, Jamieson C, Kelly SM, Layfield R, Mayer RJ. Synthesis, structural and biological studies of ubiquitin mutants containing (2S, 4S)-5-fluoroleucine residues strategically placed in the hydrophobic core. *Chem Bio Chem*, 2003, 4: 894–896
- El Oualid F, Merckx R, Ekkebus R, Hameed DS, Smit JJ, de Jong A, Hilkmann H, Sixma TK, Ovaa H. Chemical synthesis of ubiquitin, ubiquitin-based probes, and diubiquitin. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 10149–10153
- Bavikar SN, Spasser L, Haj-Yahya M, Karthikeyan SV, Moyal T, Kumar KSA, Brik A. Chemical synthesis of ubiquitinated peptides with varying lengths and types of ubiquitin chains to explore the activity of deubiquitinases. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 758–763
- Bang D, Makhataze GI, Tereshko V, Kossiakoff AA, Kent SB. Total chemical synthesis and X-ray crystal structure of a protein diastereomer: [D-Gln 35]ubiquitin. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 3852–3856
- Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc Nat Acad Sci*, 1998, 95: 6705–6710
- Vila-Perelló M, Muir TW. Biological applications of protein splicing. *Cell*, 2010, 143: 191–200
- Evans TC, Benner J, Xu MQ. Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. *Protein Sci*, 1998, 7: 2256–2264
- Hemelaar J, Galardy PJ, Borodovsky A, Kessler BM, Ploegh HL, Ovaa H. Chemistry-based functional proteomics: Mechanism-based activity-profiling tools for ubiquitin and ubiquitin-like specific proteases. *J Proteome Res*, 2004, 3: 268–276
- Borodovsky A, Ovaa H, Kolli N, Gan-Erdene T, Wilkinson KD, Ploegh HL, Kessler BM. Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol*, 2002, 9: 1149–1159
- Love KR, Pandya RK, Spooner E, Ploegh HL. Ubiquitin C-terminal electrophiles are activity-based probes for identification and mechanistic study of ubiquitin conjugating machinery. *ACS Chem Biol*, 2009, 4: 275–287
- Martin LJ, Raines RT. Carpe diubiquitin. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 122: 9226–9228

- 29 (a) Fekner T, Li X, Chan MK. Nonenzymatic ubiquitylation. *Chem Bio Chem*, 2011, 12: 21–33; (b) Strieter ER, Korasick DA. Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 52–63
- 30 Chatterjee C, McGinty RK, Pellois JP, Muir TW. Auxiliary-mediated site-specific peptide ubiquitylation. *Angew Chem*, 2007, 119: 2872–2876
- 31 Yang R, Pasunooti KK, Li F, Liu XW, Liu CF. Dual native chemical ligation at lysine. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 13592–13593
- 32 Hejjaoui M, Haj-Yahya M, Kumar KSA, Brik A, Lashuel HA. Towards elucidation of the role of ubiquitination in the pathogenesis of Parkinson's disease with semisynthetic ubiquitinated α -synuclein. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 405–409
- 33 Ajish Kumar K, Haj-Yahya M, Olschewski D, Lashuel HA, Brik A. Highly efficient and chemoselective peptide ubiquitylation. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 8090–8094
- 34 Kumar K, Brik A. δ -Mercaptolysine-assisted ubiquitination. *Isr J Chem*, 2011, 51: 900–907
- 35 Virdee S, Kapadnis PB, Elliott T, Lang K, Madrzak J, Nguyen DP, Riechmann L, Chin JW. Traceless and site-specific ubiquitination of recombinant proteins. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10708–10711
- 36 Kumar K, Spasser L, Erlich LA, Bavikar SN, Brik A. Total chemical synthesis of di-ubiquitin chains. *Angew Chem*, 2010, 122: 9312–9317
- 37 Reyes-Turcu FE, Horton JR, Mullally JE, Heroux A, Cheng X, Wilkinson KD. The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell*, 2006, 124: 1197–1208
- 38 Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB, Larsen CN, Kasperek E, Pickart CM. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: Structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry*, 1995, 34: 14535–14546
- 39 Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: Polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8: 610–616
- 40 Eddins MJ, Varadan R, Fushman D, Pickart CM, Wolberger C. Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH. *J Mol Biol*, 2007, 367: 204–211
- 41 Varadan R, Walker O, Pickart C, Fushman D. Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol*, 2002, 324: 637–647
- 42 Datta AB, Hura GL, Wolberger C. The structure and conformation of Lys63-linked tetraubiquitin. *J Mol Biol*, 2009, 392: 1117–1124
- 43 Castañeda CA, Spasser L, Bavikar SN, Brik A, Fushman D. Segmental isotopic labeling of ubiquitin chains to unravel monomer-specific molecular behavior. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 11210–11214
- 44 Castañeda C, Liu J, Chaturvedi A, Nowicka U, Cropp TA, Fushman D. Nonenzymatic assembly of natural polyubiquitin chains of any linkage composition and isotopic labeling scheme. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 17855–17868
- 45 Yang RL, KumaráPasunooti K, Li FP, Liu XW, Liu CF. Synthesis of K48-linked diubiquitin using dual native chemical ligation at lysine. *Chem Commun*, 2010, 46: 7199–7201
- 46 Valkevich EM, Guenette RG, Sanchez NA, Chen YC, Ge Y, Strieter ER. Forging isopeptide bonds using thiol-ene chemistry: Site-specific coupling of ubiquitin molecules for studying the activity of isopeptidases. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 6916–6919
- 47 Kumar K, Bavikar SN, Spasser L, Moyal T, Ohayon S, Brik A. Total chemical synthesis of a 304 amino acid K48-linked tetraubiquitin protein. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6137–6141
- 48 Kornberg RD. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974, 184: 868–871
- 49 Chatterjee C, Muir TW. Chemical approaches for studying histone modifications. *J Biol Chem*, 2010, 285: 11045–11050
- 50 Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 2001, 293: 1074–1080
- 51 Wu LP, Zee BM, Wang YM, Garcia BA, Dou YL. The RING finger protein MSL2 in the MOF complex is an E3 ubiquitin ligase for H2B K34 and is involved in crosstalk with H3 K4 and K79 methylation. *Mol Cell*, 2011, 43: 132–144
- 52 McGinty RK, Chatterjee C, Muir TW. *Semisynthesis of Ubiquitylated Proteins M. Methods in Enzymology: Non-Natural Amino Acids*. San Diego: Elsevier, 2009. 225–243
- 53 McGinty RK, Kohn M, Chatterjee C, Chiang KP, Pratt MR, Muir TW. Structure-activity analysis of semisynthetic nucleosomes: Mechanistic insights into the stimulation of Dot1L by ubiquitylated histone H2B. *ACS Chem Biol*, 2009, 4: 958–968
- 54 Chen JJ, Ai YX, Wang JL, Haracska L, Zhuang ZH. Chemically ubiquitylated PCNA as a probe for eukaryotic translesion DNA synthesis. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 270–272
- 55 Chen JJ, Bozza W, Zhuang ZH. Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 60: 47–60
- 56 Eger S, Castrec B, Hubscher U, Scheffner M, Rubini M, Marx A. Generation of a mono-ubiquitinated PCNA mimic by click chemistry. *Chem Bio Chem*, 2011, 12: 2807–2812

The chemical and semi-synthesis of ubiquitinated protein

ZHANG SiYu, LI FangYi, CHEN YongXiang*

Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, Ministry of Education; Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

*Corresponding author (email: chen-yx@mail.tsinghua.edu.cn)

Abstract: Protein posttranslational modifications (PTMs) play an essential role in regulating protein's structure and function, while abnormal PTMs can cause diseases. Ubiquitination is one of the most important PTMs in eukaryotes, and is involved in a wide range of cellular processes, such as the protein location in the cell, regulation and degradation as well as the cell cycle, gene expression, cellular signal transduction, damage repair, inflammation, immune and other life processes. However, despite of several decades of studies, several important questions remain unsolved. A major hurdle is the difficulty to obtain homogeneous ubiquitinated proteins in sufficient amounts. Recently, the chemical and semi-synthetic strategies offer solutions to overcome the obstacle. In this review, we survey the widely used methods for the chemical and semi-synthesis of ubiquitinated proteins.

Keywords: proteins posttranslational modification, ubiquitination, chemical and semi-synthesis