



基于活性和亲和性的泛素探针的发展与合成*

许玲¹⁾ 魏翠娜¹⁾ 鲁显福^{1)**} 李宜明^{2)**}

(¹⁾ 安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022; (²⁾ 合肥工业大学食品与生物工程学院, 农产品生物化工教育部工程中心, 合肥 230009)

摘要 泛素 (ubiquitin, Ub) 作为一种重要的翻译后修饰, 参与调控细胞内几乎所有的生命活动。泛素化通常由 E1s、E2s、E3s 以及去泛素化酶 (deubiquitinating enzyme, DUBs) 相互协调完成, 并在底物蛋白上形成不同链长、不同连接类型的泛素链。这些泛素链可以产生多样的拓扑结构, 被含有泛素结合域 (Ub binding domain, UBD) 的不同识别蛋白结合, 进而传递不同的信号。泛素化过程或者识别蛋白的读取一旦发生错误, 对细胞来说都可能是灾难性的。为深入了解泛素相关的生理机制, 多种泛素探针被设计与合成, 用于对目标蛋白酶或识别蛋白进行标记和监测。本综述总结了当前的泛素探针 (包括基于活性和基于亲和性的探针) 的最新发展, 并详细阐述了它们的合成策略。进一步介绍了细胞穿梭型泛素探针在活细胞内的最新应用。

关键词 泛素, 活性, 亲和性, 探针, 化学合成

中图分类号 Q51, Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0119

泛素 (ubiquitin, Ub) 是由 76 个氨基酸组成的小型球状蛋白, 并在所有真核生物中高度保守。其作为一种重要的翻译后修饰, 广泛参与调控人体的许多生理过程, 包括蛋白质降解、细胞分裂和细胞内信号传导等^[1]。泛素化过程涉及一系列酶级联反应, 包括 E1s 活化酶 (E1s)、E2s 缀合酶 (E2s) 以及 E3s 连接酶 (E3s)^[2]。E1 酶通过两步反应激活游离的 Ub。第一步, E1 酶利用 ATP 供能, 催化 Ub 的 C 端酰基腺苷酸化形成 E1: Ub-AMP, 其中 Ub 与 AMP 之间形成活性共价键, E1 酶与 Ub 之间形成非共价复合物。第二步, Ub 的 C 端转移至 E1 酶的催化 Cys 残基上形成 E1-Ub 硫酯复合物。接下来, E2 结合酶作用于 E1-Ub 的硫酯键, 形成 E2-Ub 硫酯复合物。最后在 E3 酶的作用下, Ub 从 E2 酶的半胱氨酸 (Cys) 转移到底物蛋白的 Lys 侧链上形成泛素化修饰。在人体中, 大约有 600 多个 E3 酶, 根据它们存在的特征区域与催化转移的机制分成 RING 家族、HECT 家族、RBR 家族以及 RCR 家族。RING 家族在 E3 酶中占据绝大多数, 它们不与 Ub 形成共价键, 而是直接将 E2-Ub 中的 Ub 转移到底物蛋白 (substrate, Sb); HECT (约 30 个成员) 与 RBR (约 12 个成员) 家族的 E3 酶数量相对较少, 都具有一个催化 Cys,

能够与 E2-Ub 发生转硫酯反应, 形成 E3-Ub 的硫酯中间体, 随后将泛素转移到底物上 (图 1)^[3]。RCR 家族目前仅发现 1 个 E3 酶 MYCBP2, 含有 2 个催化 Cys, 其中上游 Cys 先与 E2-Ub 发生转硫酯反应, 随后发生分子内转硫酯反应将 Ub 传递给下游的 Cys 并选择性地对底物蛋白的 Ser/Thr 进行泛素化 (图 1)^[4]。

泛素化信号也可以被各种 DUBs 水解, 从而被逆转 (图 1)^[5]。人类基因组编码大约 100 多个 DUB, 分为 7 类: 泛素羧基端水解酶家族 (UCHs)、卵巢肿瘤蛋白酶家族 (OTUs)、泛素特异性蛋白酶家族 (USPs)、Machado-Josephin 蛋白酶家族 (MJD)、JAB1/MPN/Mov34 蛋白酶家族 (JAMM)、含锌指的泛素肽酶 1 (ZUP1) 和新型的 MINDY 家族。其中, UCH、USP、OUT、ZUP1、MJD 和 MINDY 家族属于 Cys 型蛋白酶, JAMM 家族属于锌金属蛋白酶^[6]。

* 国家自然科学基金 (22207001, 22277020) 和安徽省自然科学基金 (2208085QC74) 资助项目。

** 通讯联系人。

李宜明 Tel: 13705518072, E-mail: ymli@hfut.edu.cn

鲁显福 Tel: 13866112467, E-mail: Ahluxianfu@163.com

收稿日期: 2023-04-03, 接受日期: 2023-06-18

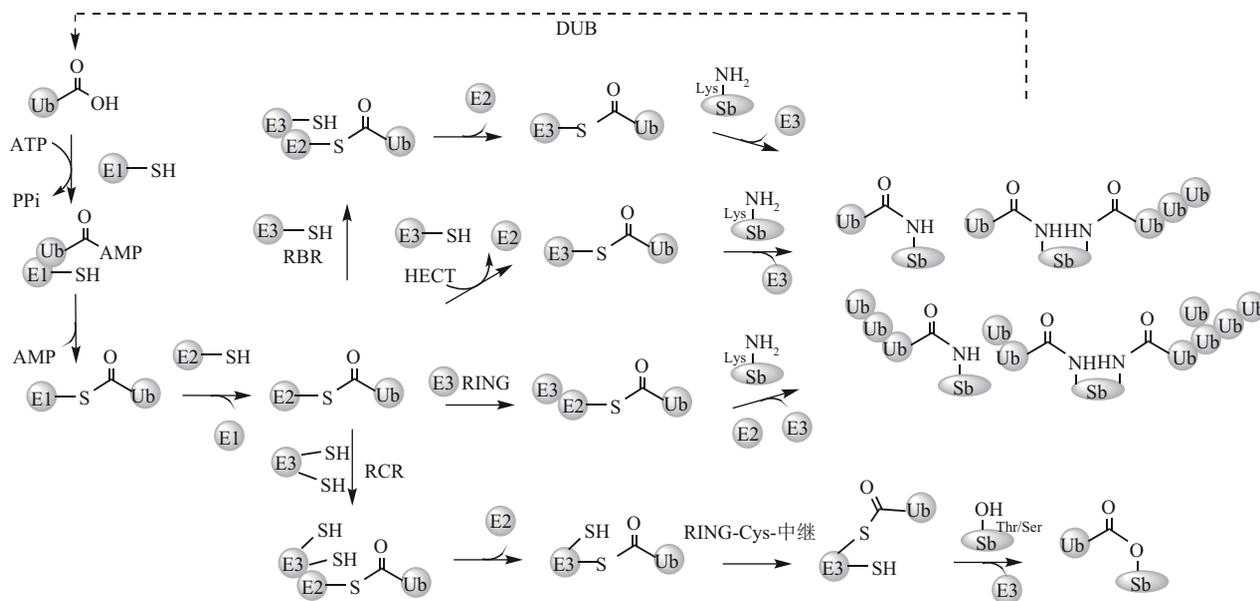


Fig. 1 Ubiquitin conjugation and deconjugation machinery

图1 泛素化及去泛素化酶学机制

Ub 既能以单体的形式也能以链的形式添加到底物蛋白上致使 Ub 信号非常复杂^[7]。通常情况下, Ub 分子通过其 C 端甘氨酸的羧基和底物中赖氨酸的 ϵ -NH₂ 基团形成异肽键从而连接到底物蛋白上^[8]。Ub 自身含有 7 个赖氨酸位点 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63), 每个赖氨酸以及 N 端 α -NH₂ 基团 (M1) 均可以被泛素化, 从而形成不同长度的同链型或异链型 (混合链) 的线性链, 或含有多个支链的分叉泛素链^[7]。这些不同长度和链型的泛素链可以被具有不同 UBDs (约 20 种) 的识别蛋白所结合从而赋予底物蛋白不同的生理结局^[9-10]。例如, K48 连接的泛素链可以被 Rad23a C 端的 UBA 结构域识别并将其连接的底物运送至 26S 蛋白酶体, 因此该链型通常作为降解的信号^[11]。K63 连接的泛素链则是作为非降解信号, 诸如 DNA 损伤位点 K63 连接的泛素链可以被 Rap80 的两个 UIM 区识别, 进而招募 BRCA1 等蛋白质修复受损 DNA^[12]。然而, 许多非典型 Ub 链类型 (如 K6、K27、K29、K33、混合链和分叉泛素链) 的生理功能仍未得到十足的理解。

为了探究泛素化的相关信号机制, 已经开发了多种化学生物学工具^[13-15]。其中, 泛素探针能以共价交联的方式捕获泛素化过程中的酶或识别蛋白, 被广泛研究^[16]。本文重点总结了作用于 Cys 型 DUB 和 Ub 缀合路径中 E1s、E2s 和 E3s 的泛素活性

探针 (activity-based probe, ABP) 以及针对识别蛋白的泛素亲和性探针 (affinity-based probe, AfBP) 的设计以及合成。此外, 本文还将介绍新涌现的细胞穿梭型泛素探针的一些进展。

1 泛素活性探针以及亲和性探针的设计

1.1 泛素探针的定义

ABP 和 AfBP 能够模仿底物与其作用的酶或结合蛋白进行共价交联。它们都是由 3 个部分组成——报告标签、识别单元和活性基团 (图 2)^[17]。报告标签通常为荧光染料或生物素 (biotin), 主要用于探针的可视化、分离或富集。识别单元是由与其作用的目标对象而决定的, 泛素探针的识别单元一般为单泛素 (mono-Ub) 分子或者是泛素缀合物 (Ub-conjugate) (缀合物既可以是 Ub 也可以是其他底物蛋白)。活性基团能够与目标蛋白产生共价交联, 它的选择将影响探针的反应性和选择性。ABP 的活性基团用于共价捕获酶的活性位点 (主要是活性 Cys), 如醛基、炔基。而 AfBP 的活性基团可将非共价相互作用转化为共价键, 如光交联基团^[18]。近年来, 基于 Ub 的 ABP 被开发出来主要用于发现和监测 Ub 相关过程的 E1s、E2s、E3s 和 DUBs 酶, 基于 Ub 的 AfBP 则被用于发现、检测与其作用的识别蛋白。

本文根据泛素探针作用对象的不同将其分为

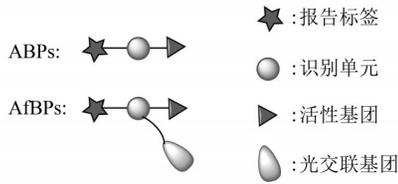


Fig. 2 Structural composition of ABPs and AfBPs
图2 ABPs和AfBPs的结构组成

DUBs ABP, E1s、E2s、E3s ABP 以及作用于识别蛋白的 AfBP。进一步, 这些探针又根据识别单元的不同分为 DUBs mono-Ub-ABP 和 Ub-conjugate-

ABP、E1s mono-Ub-ABP、E3s mono-Ub-ABP 和 Ub-conjugate-ABP、E1-E2-E3 酶级联反应 mono-Ub-ABP (Ub-Dha), 以及作用于识别蛋白的 Ub-conjugate-AfBP。

1.2 DUBs ABP

自 1997 年第一个针对 Cys 型 DUBs ABP 被开发出来 [19], 目前已经报道了许多不同的设计。这些探针根据识别单元的不同分为 mono-Ub-ABP 和 Ub-conjugate-ABP。另外, 本文根据 ABP 与 Cys 型 DUBs 作用的机理又将其分为 1,2-亲核加成、1,4-亲核加成和亲核取代反应型探针 (图 3a)。

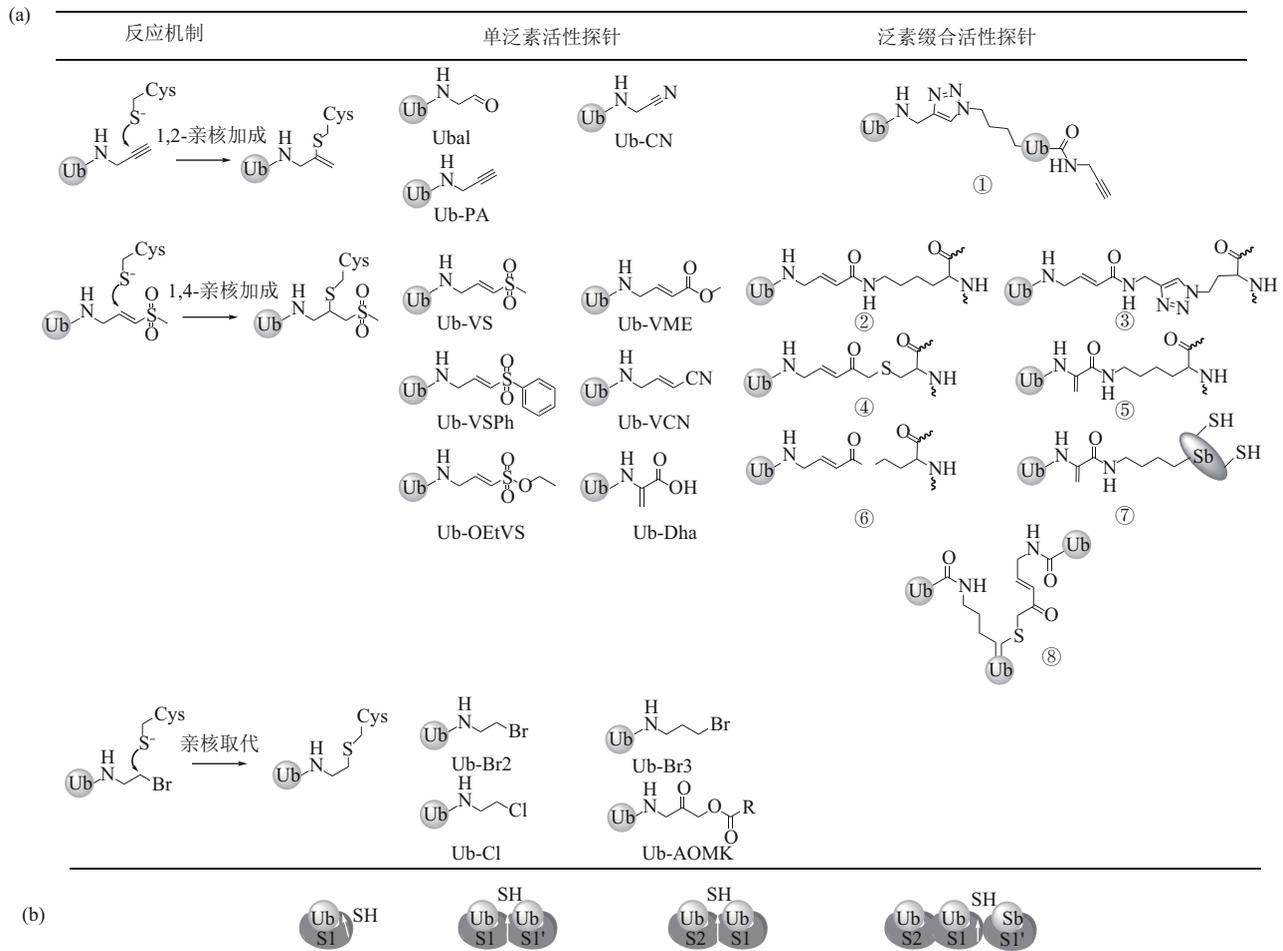


Fig. 3 DUB ABP for mono-Ub and Ub-conjugates and their design principles

图3 DUB mono-Ub-ABP及Ub-conjugate-ABP及其设计原理

(a) DUB mono-Ub-ABP及Ub-conjugate-ABP与DUB活性部位的Cys之间的反应, 分为1,2-亲核加成、1,4-亲核加成及亲核取代反应;
(b) DUB ABP与DUB结合不同的口袋区域。

1.2.1 DUBs mono-Ub-ABP

a. 1,2-亲核加成探针

泛素-甲醛 (Ubal) 和泛素-腈 (Ub-CN) 是最早开发的一批探针, Ub 末端第 76 位 Gly 被醛基或

腈基亲电基团所取代, 可以与 DUBs 活性中心的 Cys 进行 1,2-亲核加成反应 [19]。这两个探针被用于研究与 DUBs 作用的机制, 并证实了 UCHs 家族的水解酶在催化过程中会与 Ub 形成一个共价中间

体^[20-21]。此外, Johnston等^[22]使用Ubal首次解析了Ub与酵母UCH家族中Yuh1复合物的结构, 阐述了DUBs特异性水解Ub的结构基础。然而, Ubal和Ub-CN与DUBs的反应是可逆的, 且与DUBs形成的共价键不兼容SDS/PAGE的强还原条件。2013年, Ovaa课题组^[23]发展了另外一个1,2-亲核加成反应型探针——泛素-炔丙基酰胺(Ub-propargylic acid, Ub-PA/Ub-Prg), 该探针能够兼容还原及变性条件, 并与DUBs活性部位的Cys残基反应生成乙烯基硫醚的结构。目前Ub-PA探针已被得到广泛使用, 如被用于解析与多种酶的复合物结构(DUBs中vOTU^[23]、USP30^[24]、UCHL5^[25]以及HECT型E3酶HUWE1^[26])。

b. 1,4-亲核加成探针

2001年, Borodovsky等^[27]开发了第一个不可逆的DUBs ABP——泛素-乙烯基砒(Ub-vinyl sulfone, Ub-VS), 用于标记细胞裂解液中的DUBs, 并从哺乳动物的26S蛋白酶体中发现了一种新的DUB USP14。该探针还被用于监测体外脂肪生成模型中DUBs活性的变化, 发现了USP7是脂肪生成的一个调控蛋白^[28]。科学家陆续又发展了泛素-乙烯基甲酯(Ub-vinyl methyl ester, Ub-VME)、泛素-乙烯基氰(Ub-vinyl cyanide, Ub-VCN)、泛素-乙烯基苯砒(Ub-vinyl phenyl sulfone, Ub-VSPH)^[29]、泛素-乙烯基乙氧基砒(Ub-vinylethoxysulfone, Ub-OEtVS)^[30]、泛素-脱氢丙氨酸(Ub-dehydroalanine, Ub-Dha)^[31]等探针。这些探针均能够在体外或细胞裂解液中与不同的DUBs进行不同程度的交联, 其中Ub-VME因具有较强的活性而展示出最广泛的反应性^[29]。此外, Ub-VME能够有效地标记NEDD4、UBE3C、HECTD1和UBR5的HECT结构域从而用于评估HECT E3s的活性^[32]。Ub-VME也被用于生成与E3s的复合物, 如ARIH1并解析复合物结构从而阐明ARIH1进行泛素化的作用机制^[33]。

c. 亲核取代反应的探针

目前还开发了一些与DUBs的活性位点Cys进行亲核取代反应的探针, 如泛素-氯乙基(Ub-chloroethyl, Ub-Cl)、泛素-溴乙基(Ub-bromoethyl, Ub-Br2)和泛素-溴丙基(Ub-bromopropyl, Ub-Br3)^[29]。相比于Ub-VS与Ub-VME, 该类探针的反应活性稍差, 目前未得到广泛使用, 但对于鉴定某些OTU DUBs是有用的^[29]。后来, 科学家又发展了泛素-酰氧基甲基酮

(Ub-acyloxymethyl ketone, Ub-AOMK) 探针^[30], 该探针在裂解液中展现出与Ub-VME类似的活性, 然而其稳定性并不好。

1.2.2 DUBs Ub-conjugate-ABP

上述mono-Ub-ABP仅依赖于Ub与DUBs S1口袋的识别作用, 然而, 还有较多的DUB偏好于水解Ub-conjugate, 作用于远端Ub的S1、S2口袋或近端Ub的S1'口袋, 从而表现出对泛素链或底物蛋白的特异性识别(图3b)^[16]。因此, 为了研究这些DUBs的活性和泛素链选择性, 研究人员开发了Ub-conjugate-ABP。

a. 1,2-亲核加成探针

目前, Ub-conjugate-ABP中能够进行1,2-亲核加成反应的探针是2016年Ovaa课题组^[34]发展的diUb-PA, 该探针被设计用来结合DUBs中的S1和S2口袋, 并发现了S2口袋决定了OTUD2对K11连接泛素链的选择性(图3a, 结构①)。OTUD2自身对diUb的水解表现出非专一性, 然而却对K11连接的diUb-PA探针有明显的特异性。此外, OTUD2水解K11泛素链连接的底物蛋白比水解K11-diUb快得多, 这都是因为功能性的S2口袋起了作用^[35]。

b. 1,4-亲核加成探针

2012年, Franke课题组^[36]制备了第一个进行1,4-亲核加成的diUb-ABP, 作者使用Ub异肽键附近13个氨基酸的短肽来模拟近端Ub设计出了K48和K63连接的diUb-ABP(图3a, 结构②)。两个探针在体外对部分DUB产生交联, 并能够在细胞裂解液中标记到一些不同的DUBs。然而, 考虑到含有短肽的探针不能够完全代表全长diUb-ABP的反应性和选择性, 2013年, Kessler课题组^[37]合成了三氮唑连接的具有全长Ub且8种不同链类型的diUb-ABP(图3a, 结构③)。作者使用这些探针分析了细胞裂解液中DUBs对识别diUb分子的选择性。由于三氮唑结构与天然异肽键相差较大, 2014年Zhuang课题组^[38]制备了与天然异肽键结构更为类似的硫醚键连接的K48和K63连接的diUb-ABP, 并发现探针能够在细胞裂解液中对DUBs进行特异性的标记(图3a, 结构④)。同年, Brik课题组^[39]开发了基于Dha的K48和K63连接的diUb-ABP并能够在体外特异性的标记DUBs(图3a, 结构⑤)。此外, 作者还合成了线性的diUb-ABP, 并发现已知能够切割该链型的OTULIN和USP2并不与之交联, 而是对此探针进行了水解。作者认为这可能是

因为 Dha 基团放置在了 DUB 切割位点的前面使之不易接近从而发生了水解。同年 Ovaa 课题组^[40]开发了 7 种链型的含有迈克尔受体结构的 diUb-ABP, 该探针与天然 diUb 在结构上更为接近 (图 3a, 结构⑥)。作者进一步证实了它们具有链特异性。上述探针的制备策略仅适用于合成序列中不含 Cys 的 Ub-conjugate-ABP, 还有较多的底物蛋白含有多个 Cys。为了解决这个问题, 2016 年 Chatterjee 课题组^[31]使用硒代 Cys 策略构建 Dha 活性基团制备了含有多个 Cys 的 Ub-conjugate-ABP, 并使用该探针特异性的捕获了 TRIM-25 相关的 DUB USP15 (图 3a, 结构⑦)。总之, 这些探针都能够对已知链选择性的 DUBs 显示出预期的反应性: 如没有选择性的 USPs 能与大多数探针反应, 而链选择性的 DUBs 则优先与相应链型的 ABP 进行反应。2019 年, Zhuang 课题组^[41]制备了第一个 K11、K48 和 K63 连接的 triUb-ABPs (图 3a, 结构⑧)。作者使用这些探针揭示了 USP9X 分别以外切和内切的方

式水解 K48 和 K63 连接的泛素链。

1.3 E1s、E2s、E3s ABP

与 DUBs ABPs 相比, E1s、E2s、E3s ABP 相对较少, 可能是由于 Ub 对 E1s、E2s、E3s 是顺序的酶级联反应而不是与单一的酶反应。而且, E3s 中只有 HECT 与 RBR 家族的 E3 酶有一个催化的 Cys, 最大家族的 RING E3s 则不含有催化的 Cys。

1.3.1 E1s ABP

2010 年, Lu 等^[42]对 Ub 的 C 端进行 5'-磺酰腺苷修饰以模拟 Ub-AMP 结构制备了泛素-乙烯基磺酰胺探针 (Ub-vinylsulfonamide, Ub-AVSN)。该探针能够与 E1s 酶进行共价交联, 从而研究 E1s 催化的腺苷化和硫酸酯化的机制。然而, 该探针的合成步骤繁琐。为了更便捷地生成 E1s ABP, 2016 年, An 等^[43]在 Lu 的基础上将乙烯基磺酰胺替换为 Dha, 生成 Ub-Probe2-3。该探针不仅制备简单, 还能够与 E1s 酶活性位点的 Cys 形成共价键, 从而形成 E1-Ub-AMP 中间复合物 (图 4)。

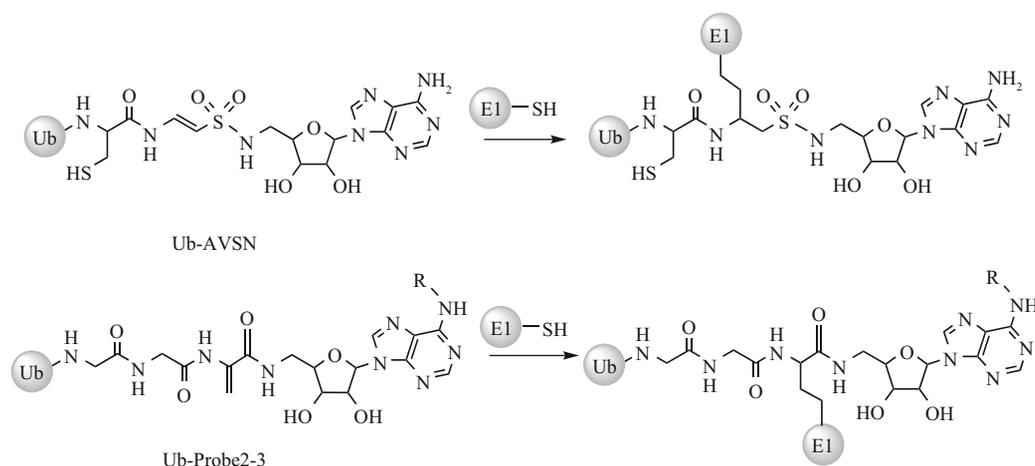


Fig. 4 E1 ABPs react with E1's active Cys

图4 E1 ABPs与E1活性Cys反应

1.3.2 E3s ABP

a. E3s mono-Ub-ABP

部分 DUBs mono-Ub-ABP 也能够与 E3 连接酶进行共价交联, 用于 HECT/RBR 家族 E3s 酶的蛋白质组学筛查和结构机制研究 (图 5)。其中, 最具有典型代表性的是 Ub-VS 探针, 它利用乙烯基砜基作为反应弹头来与 E3s 的活性 Cys 进行交联^[44]。后来, Ploegh 课题组^[30]还开发了一系列具有不同亲电基团的 E3s mono-Ub-ABP, 包括 Ub-β-内酯 (Ub-β-lactone, Ub-Lac)、泛素-乙烯基乙氧基砜

(Ub-vinylethoxysulfone, Ub-OEtVS) 和泛素-2,6-三氟甲基苄氧基甲基酮 (Ub-2,6-trifluoromethylbenzyloxymethylketone, Ub-TF₃BOK), 被用于 E3 酶活性研究。

b. E3s Ub-conjugate-ABP (又称 E2-Ub-ABP)

由于 E3s 催化的泛素化需要 E2s 酶的参与, mono-Ub-ABP 不能够用于研究 E3s 酶的一些催化过程, 如转硫酸酯化, 因此 E2-Ub-ABP 被开发出来 (图 5)。2016 年, Virdee 课题组^[45]报道了 E2-Ub-AVS 探针。为了在长度上尽可能与 E2-Ub 中间体保

持一致, 作者截短了Ub C端氨基酸的数量。利用此探针, 作者监测了Parkin的活性。进一步, 该探针也被用于细胞裂解液中E3s酶的转硫酯活性筛查, 并且发现神经元相关的E3连接酶MYCBP2能够对非赖氨酸位点的Ser和Thr(尤其是Thr)进行泛素化, 这暗示了非赖氨酸泛素化可能也在高等真核生物的细胞调节中发挥作用^[46]。2019年, 本课题组^[47]开发了另一种E2-Ub-Dha探针, 该探针制备简单, 而且在结构上与天然E2-Ub的结构也更为类似。使用该探针, 我们不仅在体外而且在细胞裂解液中标记到多个HECT E3s。2021年, Liu课题组^[48]报道了另外一种E2-Ub探针, 称为E2-Dap-Ub-Dha。该探针的泛素C端与连接E2s酶Cys之间的 α 碳的原子数目与天然E2-Ub完全相同, 可以更

好地模仿天然中间产物。作者利用该探针研究了UbcH7与Nedd4、Parkin蛋白之间的转硫酯作用。

由于RING型E3s酶直接催化Ub从E2s转移到底物上, 并不会形成E3-Ub这个中间产物, 因此上述发展的E2-Ub-ABP不能够用于研究RING型E3s。为解决这个问题, 2020年Virdee课题组^[49]发展了一种嵌入光交联的对苯甲酰-L-苯丙氨酸(*p*-benzoyl-L-phenylalanine, Bpa)的E2-Ub-Bpa探针, 用于捕获RING型E3s。为了获得最佳的光交联位点, 他们根据E3-E2-Ub复合物的晶体结构筛选了Ub中与E3s酶作用相临近的一些氨基酸, 并通过体外活性测试进行了优化。使用该探针作者证实了RING E3酶c-Cbl的活性依赖于c-Src激酶对其Y371位点的磷酸化作用。

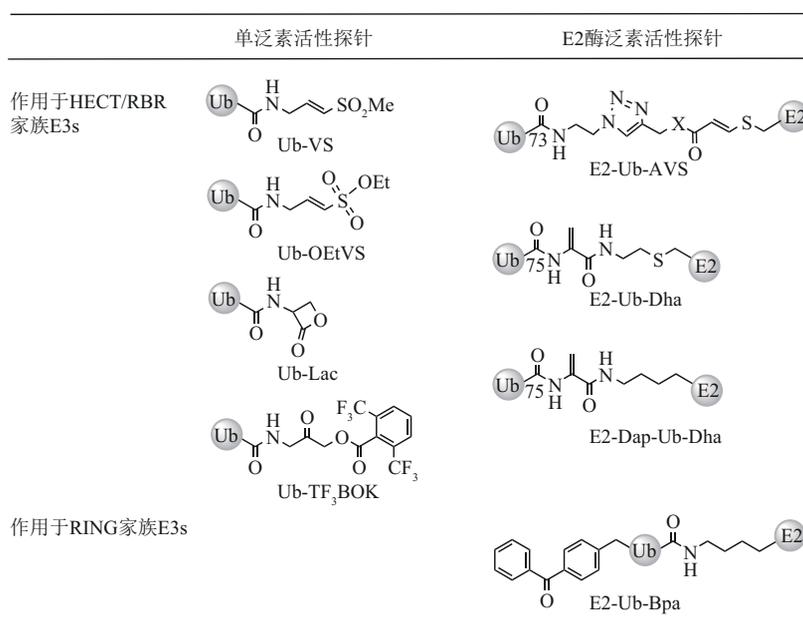


Fig. 5 Mono-Ub-ABP and E2-Ub-ABP for E3

图5 E3 ABPs (包括mono-Ub-ABP以及E2-Ub-ABP)

1.3.3 E1-E2-E3酶级联mono-Ub-ABP (Ub-Dha)

由于泛素化修饰是由E1s、E2s、E3s酶级联反应进行的。有些底物可由特异性的E1-E2-E3对修饰, 而另有一些底物可由多对E2-E3酶修饰。因此, 为了监测整个酶级联反应的过程, 发展了Ub-Dha探针(图6)^[50]。Ub-Dha能够像mono-Ub一样被E1s酶激活, 并顺序传递给E2s和E3s酶。同时, 该探针还能在每次传递过程中与E1s、E2s和E3s酶发生共价交联反应, 从而对其进行标记, 而且该探

针不会被添加到底物蛋白上。作者使用该探针在HeLa细胞和MelJuSo黑色素瘤细胞中进行了蛋白质组学筛查, 发现Ub-Dha能够在ATP的存在下标记E1酶UBE1和UBA6、E2酶UBE2S和UBE2K和E3酶UBE3A和HECTD1等, 并且发现TRIP12 E3酶只能在MelJuSo细胞系中检测到, 说明不同细胞中的E3s酶的表达水平是不同的。Ub-Dha探针可以与酶交联而不影响其构象, 使其成为研究泛素化酶级联反应的实用工具。

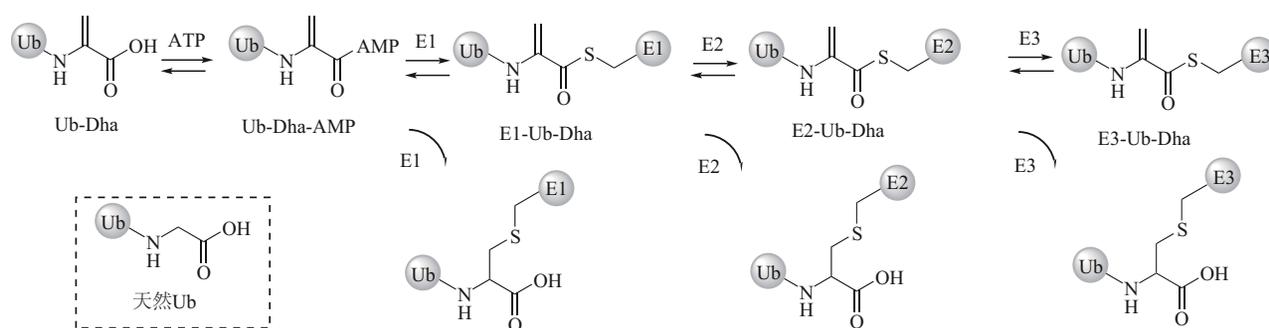


Fig. 6 “Cascading” ABP Ub-Dha, which can sequentially label E1, E2, and some E3 enzymes

图6 Ub-Dha酶级联反应传递路线图

1.4 作用于泛素识别蛋白的AfBP

泛素化修饰能够被识别蛋白结合从而调控众多细胞过程。鉴定细胞内的泛素识别蛋白，尤其是可以选择性作用于Ub-conjugate的识别蛋白，对于理解泛素化修饰的功能及调节机制具有重要的意义。然而，由于Ub-conjugate与识别蛋白的结合力较弱且为非共价键，基于Ub的ABP并不适用于鉴定泛素识别蛋白。于是，带有光交联基团的Ub-conjugate-AfBP被开发出来。在光照下，光交联官能团会产生高活性的反应中间物，并在空间上选择性地捕获非共价相互作用的蛋白质^[51]。

目前常用的光交联活性基团包括二苯甲酮、芳

基叠氮化物和双吡丙啶。二苯甲酮被相对较长的波长（350~365 nm）激活，对蛋白质的损伤较小（图7a）。激活后转化成为一个活性的双自由基，并且对甲硫氨酸有很高的亲和力和选择性。2019年，Cropp课题组^[52]在mono-Ub以及K48-/K63-diUb的多个位点引入了二苯甲酮光交联基团，并通过体外实验进一步确定了最佳交联位点T9与Q49（图7a，结构①）。作者发现，K48和K63 diUb-AfBP不仅可以与已知识别蛋白的小型UBD形成共价交联，并且能够捕获Rpn1上更大的UBD。

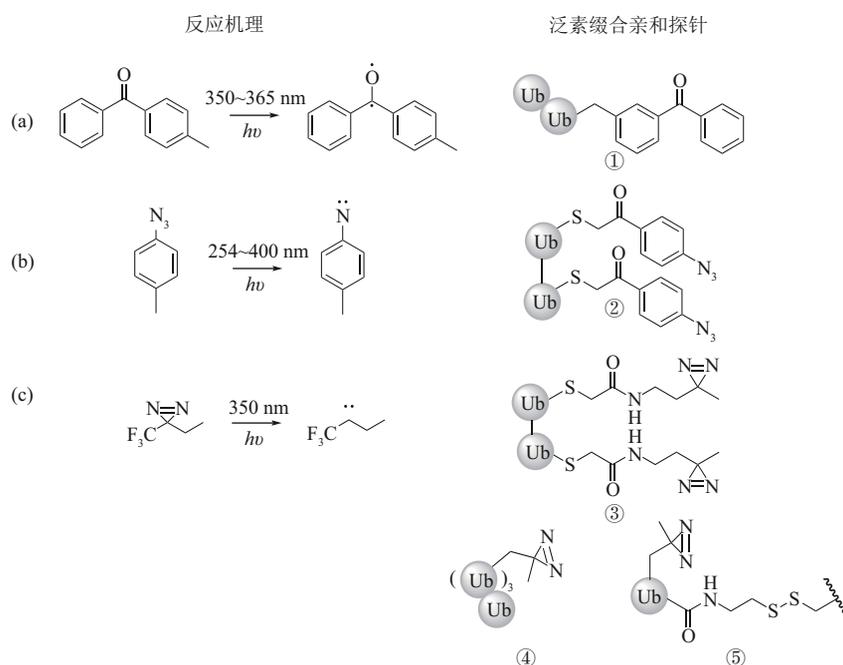


Fig. 7 Reaction mechanism of photocrosslinking groups with Ub-conjugate-AfBP

图7 光交联基团的反应机理及Ub-conjugate-AfBP

(a) 二苯甲酮; (b) 芳基叠氮; (c) 双吡丙啶。

芳基叠氮化物被光照射激活后 (254~400 nm) 失去 N_2 并产生一种叫做亚硝酸盐的反应中间物, 它可以与相邻的 C—H 或杂原子—H 键反应, 形成一个新的共价产物 (图 7b)。缺点是生理条件下会被部分还原, 导致交联效率低。2017 年, Tian 课题组^[53] 制备了 A46C 位点嵌入芳基叠氮基团的 K48 和 K63 连接的 diUb-AfBP, 并能够与 K48 链型和 K63 链型特异性结合的 UBD UBA2 和 tUIM 进行体外交联实验, 然而探针却不具有选择性 (图 7b, 结构②)。

三氟甲苯 (芳) 基双吡丙啶或烷基双吡丙啶都可以在 350 nm 的光照下通过失去 N_2 而产生一个卡宾中间体。这个中间体非常活跃, 可以迅速的与邻近的 C—H 或杂原子—H 键反应形成共价复合物。Tian 课题组^[53] 制备了 A46C 位点嵌入烷基双吡丙啶基团的 K48 和 K63 diUb-AfBP, 并且该探针也能够与相应的 UBD UBA2 和 tUIM 进行特异性的共价交联。作者还将这两个探针用于 HEK293 裂解液交联, 并鉴定出多个能与 K48-/K63-diUb 结合的蛋白质 (图 7c, 结构③)。同年, Glickman 课题组^[54] 将含有双吡丙啶的亮氨酸衍生物嵌入到泛素链中, 制备出泛素-光捕获剂 (UbPT), 并用此探针鉴定出蛋白酶体中第 3 个识别泛素链的蛋白 Rpn1 (图 7c, 结构④)。含有双吡丙啶的泛素也被用于缀合底物蛋白以研究与识别蛋白的作用机制。2016 年, Muir 课题组^[55] 制备了 UbL71 嵌入双吡丙啶的 Ub-H2B-AfBP, 并组装核小体 (图 7c, 结构⑤)。作者用此探针发现了 Ub 与 H2A 的 N 端之间发生了相互作用, 进而激活了 hDot1L 活性。

2 泛素探针的合成

泛素探针中的识别单元部分需要通过蛋白质化学合成与修饰技术获取。这部分将首先阐述识别单元中 mono-Ub 和 Ub-conjugate 的合成策略, 然后再介绍探针中活性基团的引入。

2.1 识别单元 (mono-Ub 和 Ub-conjugate) 的合成

mono-Ub 和 Ub-conjugate 含有一个共同的 Ub 模块, Ub-conjugate 还包含一个缀合物模块, 这些单体模块均可通过化学全合成或半合成的策略获得。为进一步生成 Ub-conjugate, 还需在 Ub 模块和缀合物模块之间构建异肽键。因此, 这部分将首先

介绍单体模块的合成策略, 然后再介绍异肽键的构建策略。

2.1.1 单体模块蛋白的合成策略

a. 化学全合成

Ub 模块以及缀合物模块可通过化学全合成的策略获取。固相多肽合成 (solid phase peptide synthesis, SPPS) 技术的发展使人们能够获得不同的多肽片段^[56]。然而, 随着肽链长度的增加, 链间的聚集会导致脱保护和氨基酸偶联效率的降低, 所以 SPPS 通常只限于制备大约 50 个氨基酸组成的多肽 (图 8a)^[57]。为了克服这个局限, 自然化学连接 (native chemical ligation, NCL) 被开发出来 (图 8a)^[58]。该反应是基于 C 端为硫酯的多肽与 N 端为 Cys 的多肽发生高度特异性的化学反应, 并生成一个天然的肽键。然而, 由于硫酯对哌啶不稳定, 不能直接采用 Fmoc 法固相合成, Liu 课题组^[59] 开发出基于酰肼的 NCL 连接反应, 将多肽 C 端的酰肼基团作为硫酯的前体替代物 (图 8a), 该策略在多肽连接领域已得到广泛的应用^[60-70]。

采用化学全合成制备 Ub 模块需先通过 SPPS 合成两条小于 50 个氨基酸的肽段, 并突变 A46C 用于 NCL 连接, 脱硫后就可形成天然的 Ub 模块^[71]。Ub 模块也可通过 SPPS 一次性获取, 但需添加伪脯氨酸等结构分子以提高合成效率^[72]。化学全合成可以不受遗传密码翻译机制的限制, 在任意位点添加修饰氨基酸, 而且化学全合成是一个高通量的方法, 可以在短时间内制备大量的多肽。然而, 由于涉及到多步保护、脱保护、连接和纯化操作, 该方法在用于获取较大单体模块时的产率很低。

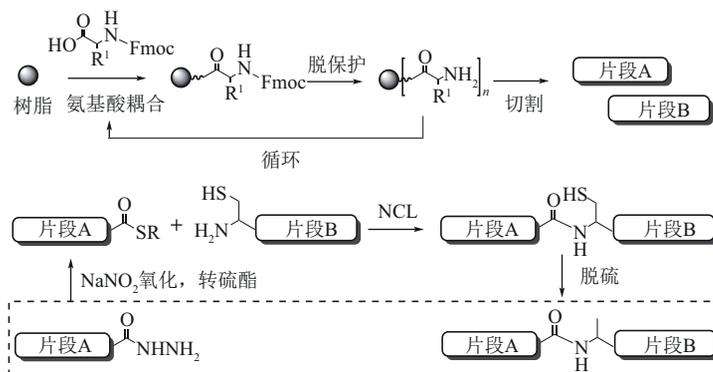
b. 化学半合成

1998 年, Muir 课题组^[73] 发展了内含肽 (Intein) 融合目标蛋白表达的策略获取较大的多肽片段, 其 C 端在外源硫醇的作用下还可生成硫酯基团以进一步用于表达蛋白连接 (expressed protein ligation, EPL) (图 8b)。通过此方法 Muir 组制备了泛素硫酯单体模块^[74]。2013 年, Macmillan 课题组^[75] 发现, C 端为 Gly-Cys 序列的多肽在缺乏 Intein 的情况下也可通过分子内 N→S 酰基转移过程生成末端为硫酯的结构, 若在反应时添加胍分子可进一步生成多肽酰肼, 利用此策略作者制备了泛素酰肼。生物酶法也可用于快速获取单体模块。例如, Liu 课题组^[76] 利用泛素水解酶 YUH1 水解 Ub (1~77D), 并在反应中加入胍分子获得 Ub (1~76)

酰肼。此外，利用E1s对Ub的活化作用也可快速制备泛素硫酯或酰肼^[77]。利用工程化的转氨酶进行连接可获得更大的单体模块。譬如Sortase介导的蛋白质半合成策略，使用这个方法需要在连接位点构建特异性的氨基酸序列（LPXTG），另外还需构建一个寡聚甘氨酸用于连接^[78-80]。只是使用该

方法会不可避免地引入多个突变氨基酸（图8b）。化学半合成结合了SPPS和重组蛋白表达系统的能力，对于大型蛋白质的获取更为方便快捷，只是在用于蛋白质功能或结构研究之前，还需进行重折叠或复性，这对于获取某些难以复性的蛋白质来说是困难的。

(a) 基于SPPS和NCL连接的蛋白质化学全合成



(b) 基于Intein和Sortase蛋白酶介导的蛋白质半合成

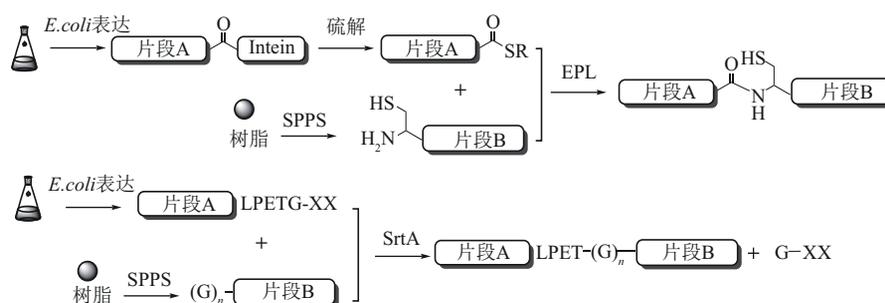


Fig. 8 Strategies for the synthesis of Ub-conjugate module

图8 单体模块蛋白的合成策略

(a) 化学全合成策略; (b) 化学半合成策略。

2.1.2 异肽键的构建

目前构建异肽键的策略可分为天然和非天然异肽键的构建。

a. 天然异肽键的构建策略

(1) 辅基连接策略

Miur课题组^[81]在赖氨酸侧链上引入了光敏性的甘氨酸辅基，该辅基可与多肽硫酯末端进行NCL反应，并在连接完成后通过UV紫外线照射即可脱除，从而制备天然的异肽键（图9a）。然而，光敏甘氨酸辅基分子不仅合成繁琐，而且在用于NCL的连接效率也较差，从而限制了该策略的应用。之后，Liu课题组^[67, 82]发展了一种相对合成

步骤较少的酸敏性的甘氨酸辅基，并兼容酰肼NCL，连接完成后仅需通过TFA的切割试剂即可脱除（图9b）。2014年，Chatterjee课题组^[83]发展了另外一种用于NCL连接的2-氨基氧乙硫醇辅基，该辅基相对前两者来说制备简单，然而需要在含有Zn的强酸性盐酸胍溶液中进行脱除（图9c）。此外，由于在Cys连接处的是二级胺，导致反应效率不高。辅基连接策略构建天然异肽键是化学合成方法中的重要选择，相应的辅基小分子尤其是酸敏性辅基已经商业化，可在化学合成中直接使用。

(2) 巯基赖氨酸策略

Liu课题组和Brik课题组分别报道了用γ巯基

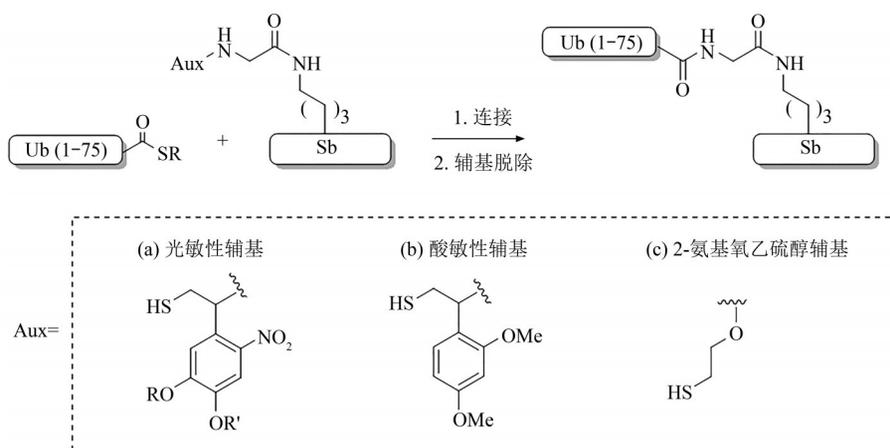


Fig. 9 Auxiliary-mediated ligation strategy for the construction of native isopeptide bonds

图9 辅基连接策略构建天然异肽键

赖氨酸^[84-85]和 δ 巯基赖氨酸^[86-88]构建异肽键的方法(图10)。将 γ 或 δ 巯基赖氨酸通过SPPS嵌入到所需的位点,然后与多肽硫酯片段进行NCL反应,最后再进行脱硫即可形成天然的异肽键。其中,Liu课题组设计的 γ 巯基赖氨酸不仅可以介导侧链

ICL形成异肽键也可以介导主链的NCL反应。巯基赖氨酸比光敏和酸敏甘氨酸辅基介导的NCL连接效率高得多。然而,由于该类型的非天然氨基酸的合成较为复杂,即使Ovaa课题组^[89]优化了 γ 巯基赖氨酸的合成,目前也未得到广泛应用。

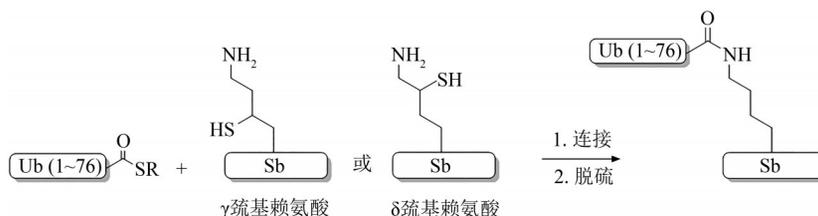


Fig. 10 Thiolsine-mediated ligation strategy for the construction of native isopeptide bonds

图10 巯基赖氨酸策略构建天然异肽键

(3) IsoUb (isopeptide-linked 76-mer Ub) 策略
Liu课题组^[90]发展了一种异肽键连接的泛素IsoUb异构体作为构建单元合成天然的泛素链(图11)。这个IsoUb异构体由泛素的两个多肽片段组成,共76个氨基酸。该异构体的特点是直接通过SPPS构建异肽键,且该片段C端是酰肼基团,N端是Cys,使多肽的两端都可进行NCL。使用此方法,作者合成了迄今为止使用化学全合成策略获取的最大蛋白质K11/K48-分叉六泛素(456个氨基酸)。该策略构建天然异肽键时无需预先合成连接小分子单元,且NCL发生在肽主链上,大大提高了连接效率并且降低了水解副产物的生成。该策略的不足是需要要在SPPS中添加伪脯氨酸和2,4-二甲

氧基苄基修饰的甘氨酸,致使合成的成本较高,而且反应是在高温的专业仪器中进行,对于部分实验室难以达到。

(4) 非天然氨基酸(巯基赖氨酸)嵌入的策略
Chin课题组^[91]报道了使用非天然氨基酸嵌入技术将 δ 巯基赖氨酸衍生物嵌入到重组蛋白质用于制备泛素化蛋白(图12)。作者首先定向进化了tRNA合成酶生成特定的吡咯赖氨酸-tRNA合成酶(PyIRS)/tRNA_{CUA}对,然后将 δ 硫代赖氨酸衍生物定点嵌入到重组蛋白质中。嵌入巯基赖氨酸的蛋白质可以直接与泛素硫酯进行连接,脱硫后即可形成具有天然异肽键的产物。应用该策略极大地简化了蛋白质合成的步骤,但受嵌入位点的影响,非天然

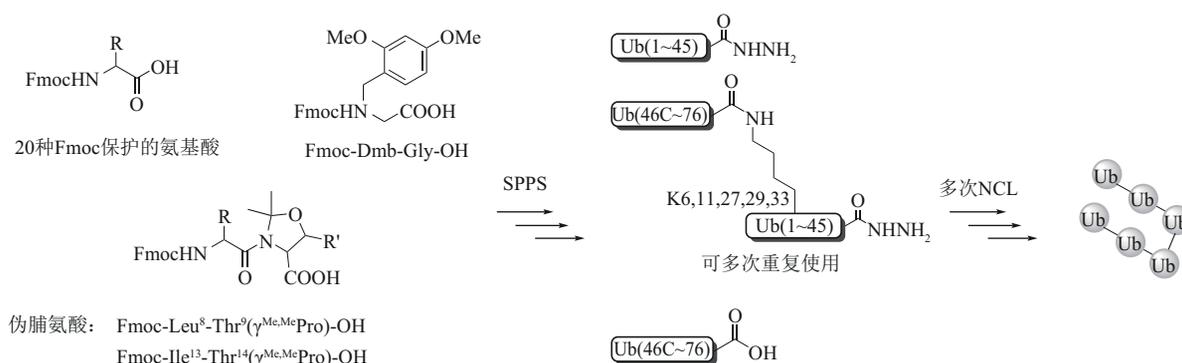


Fig. 11 IsoUb-mediated chemical synthesis strategy for the construction of native isopeptide bonds

图11 IsoUb策略构建天然异肽键

氨基酸在不同蛋白质中嵌入效率不同，可能并非适用于所有蛋白质。此外，在需嵌入两个以上位点

时，效率极低，进一步限制了其应用。

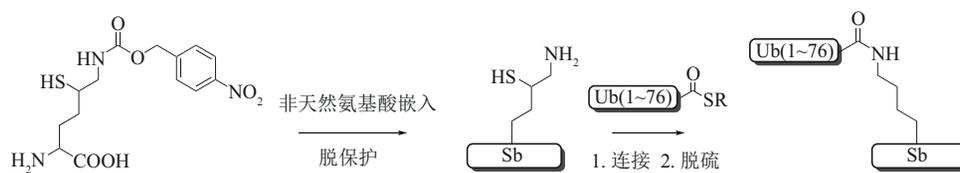


Fig. 12 Genetically incorporated unnatural amino acids strategy for the construction of native isopeptide bonds

图12 非天然氨基酸嵌入技术构建天然异肽键

(5) GOPAL 氨基酸正交保护策略

Chin 课题组^[92]开发了基因编码的正交保护和激活连接 (genetically encoded orthogonal protection and activated ligation, GOPAL) 策略构建异肽键并合成多聚泛素链 (图 13)。在该策略中，作者使用 PylRS/tRNA_{CUA} 对将侧链 Boc (butoxycarbonyl) 保护的天然氨基酸 H-Lys (Boc) -OH 嵌入到泛素的特定位点中，然后用 Boc 的正交保护基团 Cbz (carbobenzyloxy) 掩蔽蛋白质上剩余的游离氨基。进一步脱去 Boc 基团暴露出嵌入的赖氨酸的侧链氨基，最后在银离子介导下与侧链氨基被 Cbz 保护的泛素硫酯进行缩合和连接，最终再脱除所有的 Cbz 基团从而获得天然连接的 diUb。Fushman 课题组^[93]改变 Cbz 这一正交保护基团而使用了 Alloc (allyloxycarbonyl) 这一保护基团，该保护基可以在钌等金属催化剂下进行脱除 (图 13b)。Liu 课题组^[94]则使用了突变的甲硫氨酸氨酰基-tRNA 合成酶和 tRNA 对将叠氮正亮氨酸 H-Anl-OH (azidonorleucine, Anl) 嵌入泛素特定

位点中并使用 Boc 这一正交保护的策略，获得了具有天然异肽键的 diUb 和泛素化组蛋白 H2A (图 13a)。本课题组^[95]将 H-Lys (Proc) -OH (propargyloxycarbonyl, Proc) 定点嵌入到 Ub1-75Cys，之后利用 N→S 迁移策略将其 C 端转化为酰肼基团，然后使用 Boc 掩蔽该蛋白质剩余游离的氨基，脱除 Proc 保护基后将甘氨酸辅基构建到 Ub1-75NHNH₂ 的异肽键连接的位点。最终再脱除所有的 Boc 保护基后得到一种可二次 NCL 连接的泛素单元。运用该策略，我们不仅制备了单一链型的 K48 和 K6 连接的 triUb，还制备了由 K48 和 K6 组成的混合链型的 triUb (图 13a)。氨基酸正交保护策略结合了生物表达以及非天然氨基酸嵌入技术，可在短时间大量获取反应原料。缺点是需同时进行多个 Cbz 与 Alloc 保护基的脱除，不仅条件苛刻且效率极低，即使替换成条件较温和的 Boc 保护基，效率也较差。此外，银、钌、钯等重金属的使用不可避免导致金属残余。

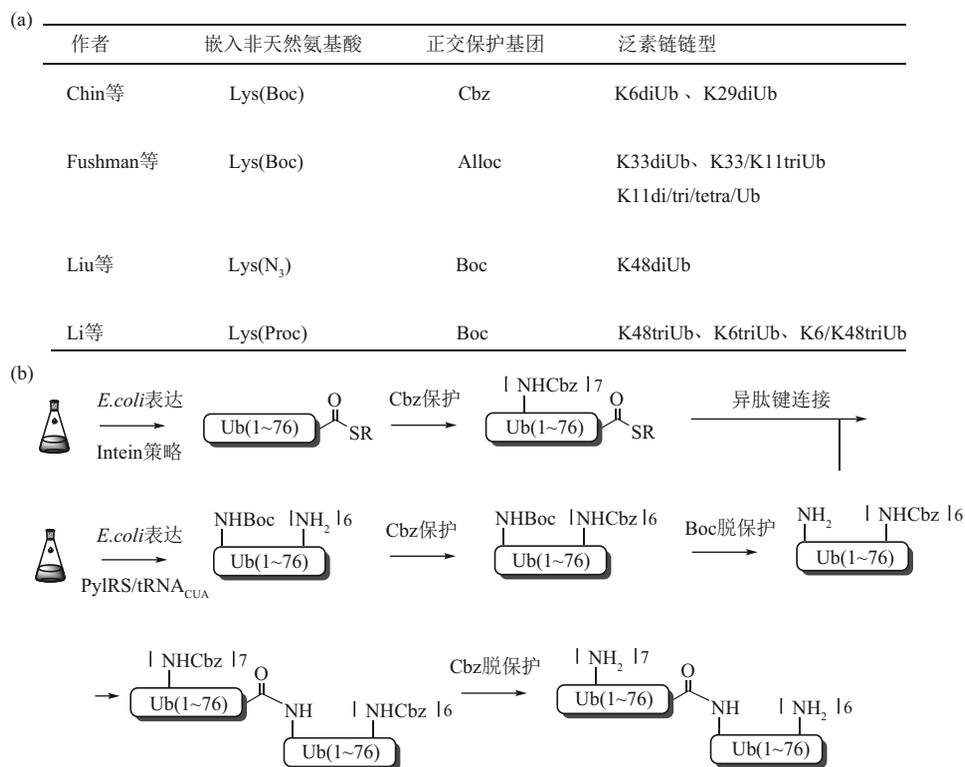


Fig. 13 GOPAL approach strategy for the construction of native isopeptide bonds

图13 GOPAL氨基酸正交保护策略构建天然异肽键

(a) 各种正交保护策略; (b) GOPAL策略合成链接特异性diUb。

b. 非天然异肽键的构建策略

相比于获取天然异肽键连接的Ub-conjugate, 运用某些化学策略更易于实现非天然异肽键连接的Ub-conjugate的制备(图14)。

(1) 基于Cys策略: 二硫键连接和Thiol-ene反应

Miur课题组^[96]与Zhuang课题组^[97]分别报道了使用二硫键连接策略制备Ub-conjugate(图15a)。他们首先表达出Ub-Intein后使用巯基乙胺试剂进行氨解获得泛素-巯基乙胺蛋白, 同时将缀合物异肽键连接位点的Lys突变为Cys。然后两组分别使用了2,2'-二硫双(5-硝基吡啶)(2,2'-dithiobis(5-nitropyridine), DTNP)^[96]和5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)^[97]作为活化试剂制备了二硫键连接的泛素化的组蛋白H2B和泛素化的PCNA。该方法操作简单, 能较快地获得目标产物, 而且二硫键具有较强的稳定性, 可以在多种条件下保持不变性。缺点是连接形成的类异肽键比天然异肽键长, 而且二硫键具有一定的可逆性, 在还原条件下会导致二硫键的

断裂。

Strieter课题组^[98-99]运用Thiol-ene化学反应制备了多种类型的Ub-conjugate(图15b)。他们获得Ub硫酯后与烯丙基胺分子进行反应将烯丙基引入泛素的C端, 同时将缀合物异肽键连接位点的Lys突变为Cys。在光引发剂的存在下, 烯丙基与巯基反应生成硫醚键。该方法操作简单, 能较快地获得目标产物。然而, 硫醇-烯反应的效率很低, 产率仅30%左右。

(2) 1,3-二氯/溴丙酮交联策略

Wilkinson课题组^[100]与Wolberger课题组^[101]利用1,3-二氯/溴丙酮交联的策略制备了Ub-conjugate(图16a)。大肠杆菌表达Ub76Cys, 同时将缀合物蛋白异肽键连接位点的Lys突变为Cys。在含有上述两种蛋白质的溶液中添加1,3-二氯/溴丙酮进行反应即可连接形成Ub-conjugate。然而, 使用该策略会使反应混合物中生成至少4种不需要的副产物, 并需多次分离纯化, 从而导致产物总产率低于10%。Pratt课题组^[102]改进该策略, 将泛素硫酯氨解生成的泛素-巯基乙胺替代Ub76Cys与缀合

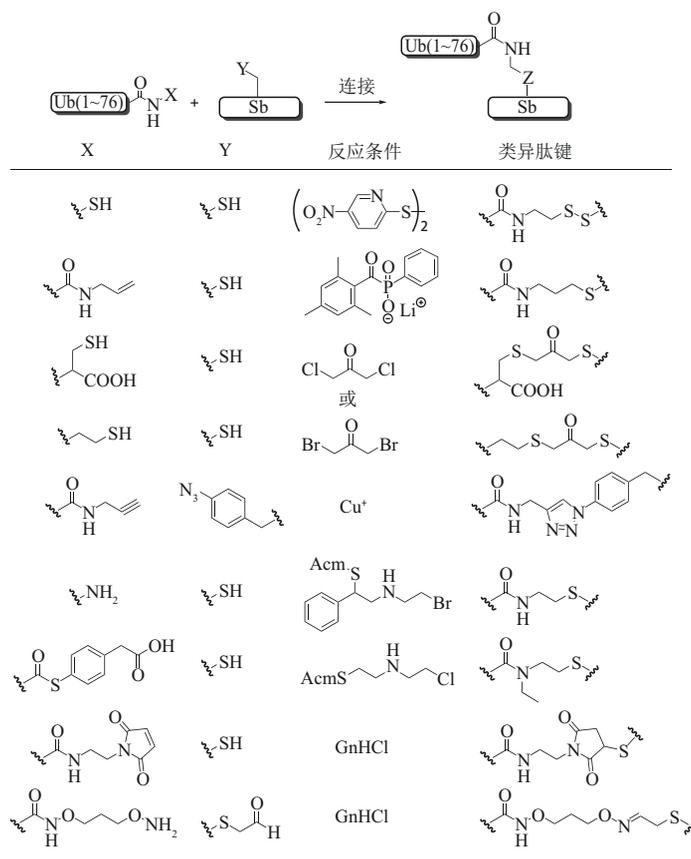
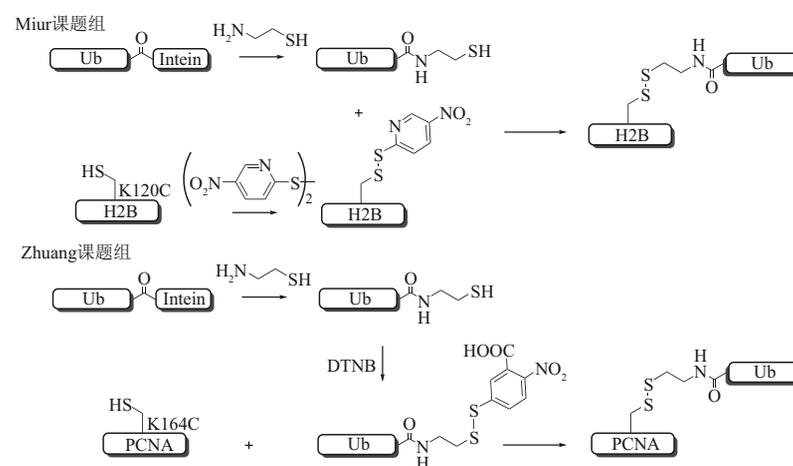


Fig. 14 Biorthogonal ligation strategy for the construction of non-native isopeptide bonds

图14 生物正交连接策略构建非天然异肽键

(a) 二硫键连接策略



(b) Thiol-ene连接策略

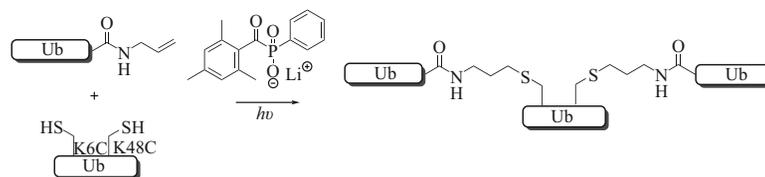


Fig. 15 Cysteine-based methods for the construction of non-native isopeptide bonds

图15 基于Cys策略生成非天然异肽键

(a) 二硫键连接策略; (b) Thiol-ene反应连接。

物蛋白反应可以生成更多的目标产物, 并且使用 1,3-二溴丙酮能大幅提升产物的产率, 并生成较纯的目标产物 (图 16b)。2020 年, 本课题组^[103] 继续优化了该反应, 开发出一锅连接策略制备泛素化的组蛋白 (图 16c)。首先, 我们探索了 Ub76Cys 与 1,3-二溴丙酮反应的最佳条件, 发现这一反应在酸性 (pH=4.5~5.0) 硼酸盐缓冲溶液中进行, 达到 90% 的反应效率。之后, 并未分离这一中间产物, 而是使

用冰乙醚除去多余的 1,3-二溴丙酮, 然后调节溶液 pH 至 6.5~7.0, 添加组蛋白 H2B 以启动原位偶联生成二硫代丙酮连接的泛素化的 H2B, 产率高达 85%。经改进后的策略不仅操作简单, 而且一锅反应大大提高了产物的产率。总之, 1,3-二氯/溴丙酮交联策略是一种高选择性、高效率的反应, 且该方法反应条件相对温和, 可以在非变性的条件下进行反应, 是获取 Ub-conjugate 的一种较好选择。

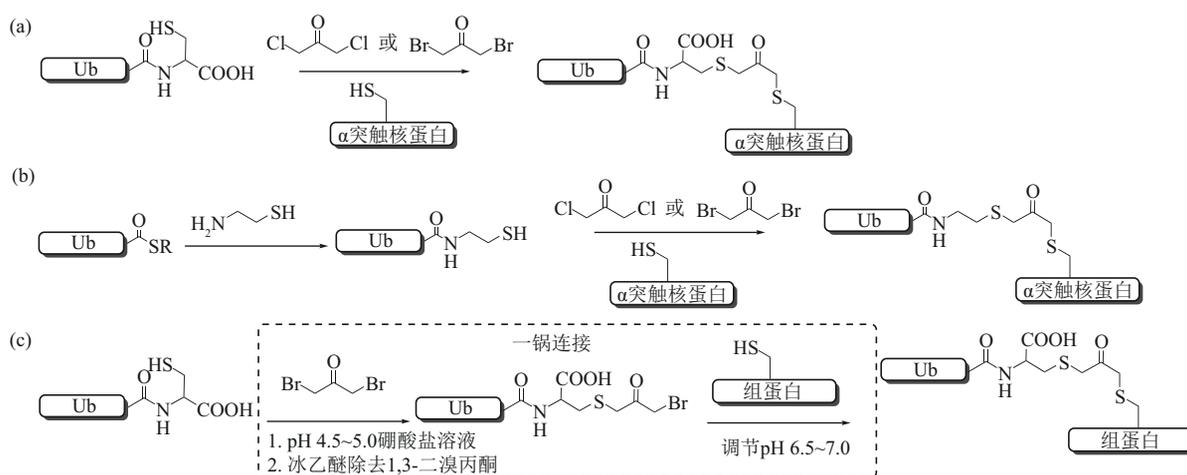


Fig. 16 1,3-Dichloroacetone/1,3-dibromoacetone crosslinking methods for the construction of non-native isopeptide bonds

图16 1,3-二氯/溴丙酮交联策略生成非天然异肽键

(a) Ub76Cys与底物蛋白进行烷基化反应; (b) 泛素-巯基乙胺与底物蛋白进行烷基化反应。

(3) 叠氮-炔环加成反应 (azide-alkyne cycloaddition reaction, click reaction)

通过点击化学 (click chemistry) 也可快速实现 Ub-conjugate 的制备。Rubini 课题组^[104] 利用非天然氨基酸嵌入技术将侧链带有炔烃的吡咯赖氨酸类似物嵌入到缀合物蛋白的特定位点, 并将叠氮高丙氨酸 (azidohomoalanine, Aha) 嵌入到泛素 C 端第 76 位 (图 17a)。Mootz 课题组^[105] 则将带有叠氮基团的酪氨酸类似物通过非天然氨基酸嵌入技术将其嵌入到缀合物蛋白的特定位点, 同时将炔烃官能团通过 Intein 策略引入到泛素 C 端 (图 17b)。然后, 含有炔烃和叠氮这两个正交基团的泛素在铜的催化下发生点击化学反应形成三唑键连接的 diUb, 并能够抵制 DUB 的水解。叠氮-炔环加成反应条件相对温和, 而且反应具有特异性和高效性, 缺点是生成的三氮唑结构与天然异肽键相差较大。

(4) 氨乙基化-NCL 耦合策略

2019 年, 本课题组和 Liu 课题组^[76] 共同开发

了 Cys-氨乙基化辅助化学泛素化 (cysteine-aminoethylation-assisted chemical ubiquitination, CAACU) 策略合成泛素化的组蛋白 (图 18a)。该策略是通过 Cys-氨乙基化反应将 β -氨基卤代物辅基 (连接完成后可脱除) 装载至组蛋白的特定位点, 随后经辅基介导的 NCL 连接制备泛素化的组蛋白。泛素化组蛋白可以很容易地重组到核糖体中, 并被相关作用蛋白选择性地识别。该策略还进一步被用于合成通过传统方法较难获取的 K27 连接的三泛素^[106]。该策略连接形成的硫醚键与天然异肽键相比, 在结构上仅有一个原子的替换, 而且化学性质稳定, 也可以被 DUBs 识别和水解, 只是在应用时需提前化学合成连接所需的辅基小分子。2020 年, Liu 课题组^[77] 又发展了 E1 酶催化的化学酶法策略制备了异肽键-N-乙基化的泛素链 (图 18b)。该策略也是通过 Cys-氨乙基化反应将双功能的氨乙基卤代物分子装载至 Ub 的特定位点, 随后脱去 Acm 基团后通过 NCL 反应与 Ub 硫酯连接, 最后进行脱硫

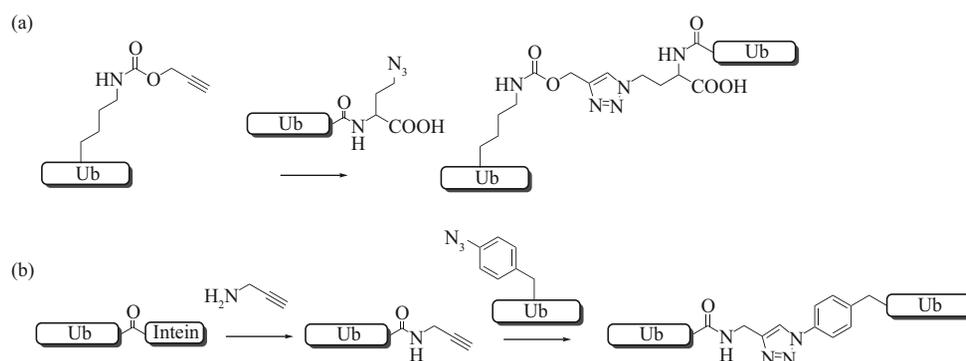


Fig. 17 Click reaction for the construction of non-native isopeptide bonds

图17 点击化学生成非天然异肽键

(a) Rubini课题组点击化学制备diUb; (b) Mootz课题组点击化学制备diUb。

产生N-乙基异肽键连接的diUb。此外，当氨乙基化的Ub分子的C端同时存在硫酯官能团时，该分子自身可以发生多次聚合形成多聚泛素链，而且该策略还可被用于分叉泛素链和泛素化H2A/cyclin B1的合成^[107]。相较于CAACU策略，该策略只需通过简单的化学反应就可获得辅基连接分子，并且

制备的泛素化缀合物能够抵制DUB的水解，还可用于蛋白质组学探查。然而，氨乙基化-NCL耦合策略都要求缀合物蛋白仅含有一个Cys，而且反应是在变形条件下发生的，需要对形成的Ub-conjugate进一步折叠复性。

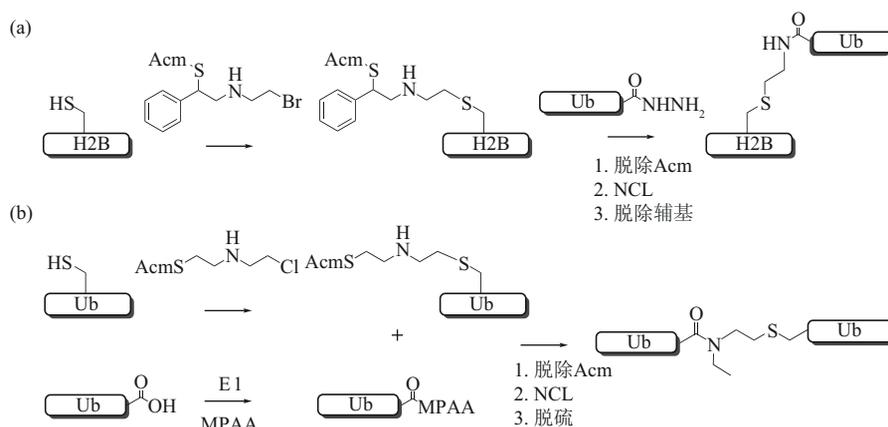


Fig. 18 Aminoethylation-NCL coupling method for the construction of non-native isopeptide bonds

图18 氨乙基化-NCL耦合策略生成非天然异肽键

(a) CAACU策略; (b) E1催化的化学酶法策略。

(5) 马来酰亚胺与巯基耦合的策略

Brik课题组^[108]发展了马来酰亚胺与巯基耦合的策略制备Ub-conjugate (图19)。泛素酰肼经NaNO₂氧化后添加N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺进行氨解生成末端含有马来酰亚胺基团的泛素蛋白。该蛋白质分子与含巯基的缀合物进行反应即可生成Ub-conjugate。该策略操作简单、条件温和、反应

快速高效，5 min即可达到67%的产率，但是形成的化学键与天然异肽键差异较大。

(6) 脞键形成策略

Brik课题组^[109]发展了由醛-氧胺反应形成脞键的策略制备Ub-conjugate (图20)。泛素硫酯与1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷反应生成C端含有氧胺基团的泛素，同时将连接位点Lys突变为Cys的缀合

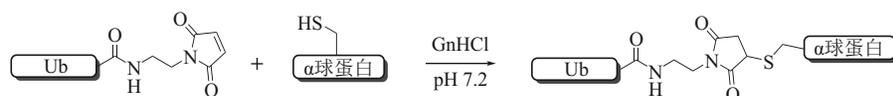


Fig. 19 Maleimide–Cys coupling method for the construction of non-native isopeptide bonds

图19 马来酰亚胺与巯基耦合的策略生成非天然异肽键

物与氯乙醛反应形成含有醛基的缀合物。然后将两种蛋白质在酸性条件下反应形成肽键连接的 Ub-conjugate。醛-氧胺反应快速高效, 而且肽键能够抵制 DUBs 的水解和蛋白酶体的降解。通过该策略, 作者合成了 mono-/di-/tri-/tetra-Ub- α 球蛋白 (α -globin) 和分叉 di-(di-Ub)- α -globin, 并且将这些产物与 26S 蛋白酶体进行孵育, 作者发现, 相较于

于 mono-/di-/tri-Ub- α -globin, tetra-Ub- α -globin 能够提供一个很好的水解信号, 此外, 分叉 di-(di-Ub)- α -globin 并不能够比 tetra-Ub- α -globin 对底物进行更有效的降解。这可能是由于 tetraUb 封闭的紧凑构象的特点导致其对蛋白酶体上的 DUBs 的水解有抵抗力从而提供了较长的驻留时间, 致使 26S 蛋白酶体对其有更好的降解。

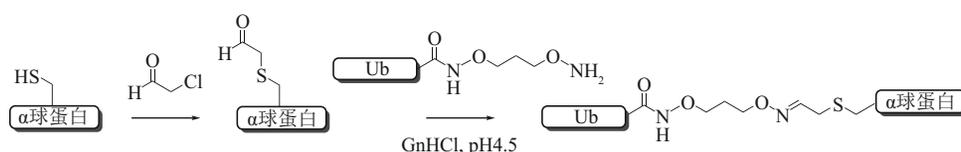


Fig. 20 Oxime-formation method for the construction of non-native isopeptide bonds

图20 肟键形成策略生成非天然异肽键

2.2 引入活性基团制备泛素探针

2.2.1 硫酯氨解法制备mono-Ub-ABP

将 mono-Ub C 端的硫酯进行氨解可以制备多种 mono-Ub-ABP, 如 Ub-VS、Ub-VME、Ub-VSPH、Ub-VCN、UbBr3、UbBr2、UbCl^[29] 以及 Ub-PA^[110] 等

(图 21)。这些 mono-Ub-ABP 都可以选择性地与含有活性 Cys 的泛素蛋白酶发生反应。其中 Ub-Dha 的制备无需进行氨解反应, 而是大肠杆菌表达出 Ub76Cys 后, 使用 2,5-二溴己二酰胺将 76 位 Cys 的巯基脱除从而轻松获取^[50]。

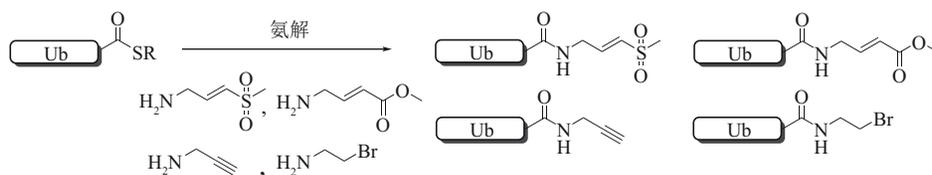


Fig. 21 Preparation of mono-Ub-ABP by thioester aminolysis

图21 硫酯氨解法制备mono-Ub-ABP

2.2.2 引入化学活性基团制备Ub-conjugate探针

a. 化学活性基团的引入策略及合成 Ub-conjugate-ABP

Ub-conjugate-ABP 引入的化学反应活性基团大致可以分为 3 类。(1) 迈克尔受体结构 (图 22a)。Franke 课题组^[36] 通过 SPPS 氨基酸耦合策略将含有

迈克尔受体结构的甘氨酸乙烯甲酸引入到全保护的多肽序列中, 然后将获得的多肽片段对泛素硫酯分子进行氨解制备了第一个 diUb-ABP (图 22a, I)。Kessler 课题组^[37] 直接将带有迈克尔受体结构的分子对泛素末端进行氨解将活性基团添加到泛素分子中, 然后与含叠氮的泛素受体进行点击化学反应合

成了8种不同连接类型的 diUb-ABP，并应用于 DUB 特异性的分析 (图 22a, II)。Zhuang 课题组^[38] 同样通过氨解反应在泛素 C 端引入含有迈克尔受体的连接 linker，然后与连接位点 Lys 突变为 Cys 的 Ub 发生亲核取代反应制备 diUb-ABP (图 22a, III)。Ovaa 课题组^[40] 通过 NCL 获得 diUb 后，用 2,5-二溴己二酰胺脱硫获得迈克尔受体结构合成了与天然 diUb 在结构上更为接近 diUb-ABP，并证明它们对 DUB 具有链选择性 (图 22a, IV)。Zhuang 课题组^[41] 通过氨解反应在泛素 C 端引入含有迈克尔受体的分子后，利用位点特异性的 E1、E2 酶和亲核取代反应制备了 triUb-ABPs，并用来研究 DUB 对泛素链进行内、外切水解的特性 (图 22a, V)。(2) α,β -不饱和氨基酸-Dha (图 22b)。

Brik 课题组^[39] 通过利用 NCL 随后 Dha 形成的方法，开发了基于 Dha 的 diUb-ABP (图 22b, VI)。进一步，为了探索 HECT E3 酶的活性，本课题组制备了 E2-Ub-Dha 的活性探针，该探针能够通过半合成的方法快速获得，而且获取的探针与 E3 酶具有很好的交联活性^[47]。Chatterjee 课题组^[31] 利用硒代 Cys 的策略制备了含有 Dha 的 Ub-conjugate-ABP，这使得缀合物中即使含有多个 Cys 也能够选择性地生成 Dha 基团 (图 22b, VII)。(3) PA 活性基团 (图 22c)。Ovaa 课题组^[34] 通过使用点击化学和氨解反应制备了近端泛素 C 端带有炔基的非水解 diUb-ABP，并应用该探针确定了一些 DUB 对泛素链型特异性的偏好是由 S2 口袋介导的 (图 22c, VIII)。

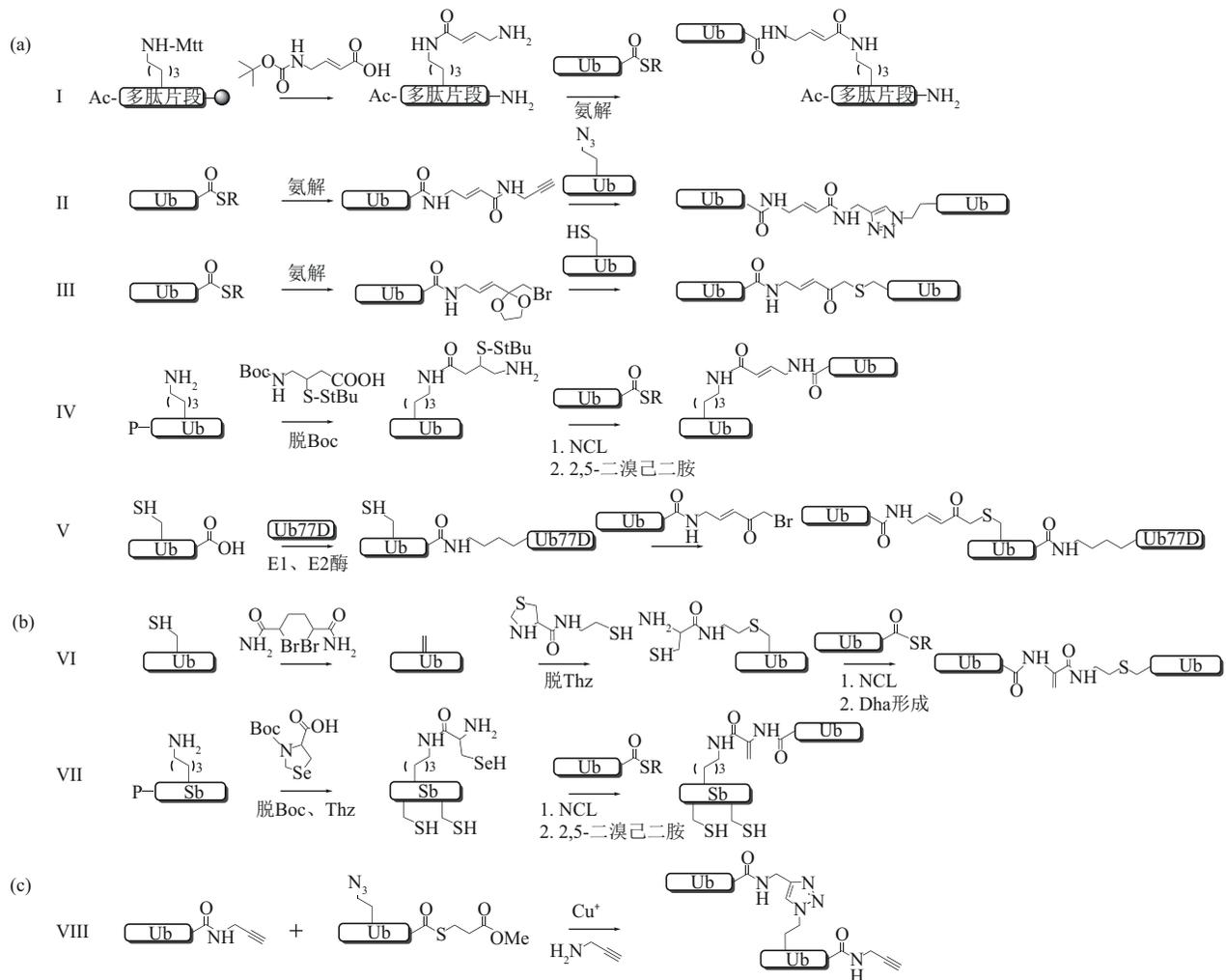


Fig. 22 Preparation of Ub-conjugates ABP

图22 Ub-conjugate-ABP的合成

(a) 引入迈克尔受体结构；(b) 引入 α,β -不饱和氨基酸Dha；(c) 引入PA活性基团。

H2A 蛋白进行交联, 并进一步确定了H2A的N端与Ub的相互作用激活了hDot1L的活性并导致hDot1L在核小体表面的重新定位。双吡丙啶相较于二苯甲酮和芳基叠氮位阻更小, 使得研究对象更易保持原有生物活性。此外, 双吡丙啶的光稳定性更高, 并且使用长波长紫外光(330~370 nm)即可活化。激活后的卡宾具有高化学活性, 更利于捕捉目标蛋白。总之, 光交联探针可以捕捉到弱的或短暂的蛋白质-蛋白质相互作用, 并为探索未知结合蛋白提供了机遇。

3 细胞穿梭型Ub ABP

上述发展的泛素探针通常局限于体外纯净体系和细胞裂解液的环境中。由于细胞裂解会导致原有的细胞环境发生改变——蛋白质稀释、正常组织被破坏以及部分含酶的蛋白质复合物解离致酶失活, 这使得科学家们无法对真实的细胞环境中泛素系统酶活有更全面的认知^[113]。近年来, 随着穿膜技术的发展, 更多的细胞穿梭肽(cell penetrating peptide, CPP)被开发出来, 并进一步应用于制备细胞穿梭型Ub ABP, 这使得原位研究泛素酶活性成为可能。目前, 细胞穿梭型Ub ABP大致可分为原位穿膜和时间分辨穿膜Ub ABP^[114]。其中, TAT和多聚精氨酸(主要为R10)由于其较好的穿梭活性而被得到广泛使用, 尤其是环化后的cTAT和cR10, 刚性结构增加, 穿膜效果更强^[115-116]。

3.1 原位穿膜Ub ABP

为进一步拓展对DUB在生理相关环境中生物学功能的认识, Zhuang课题组^[117]将Ub与CPP耦合构建了穿膜Ub ABP。作者首先通过氨解反应获取Ub-PA, 然后二硫键连接cR10制备了HA-cR10-Ub-PA(图24a)。体外验证其交联活性后, 作者又按照类似的合成策略制备了C端带有荧光分子罗丹明(tetraethyl-rhodamine, TER)的HA-cR10-Ub-MAL-TER。荧光活细胞成像显示, 探针能够有效地穿透HeLa细胞膜。接下来, 作者将HA-cR10-Ub-PA分别进行细胞裂解液交联和细胞穿膜的交联实验, 蛋白质组学分析后发现, 该探针在HeLa细胞内捕获的DUB的数量(27个)比在细胞裂解液中的DUBs(10个)多, 这在一定程度上说明了穿膜探针的优势。为了探究S65位磷酸化对Ub在细胞中定位和缀合机制的影响, Brik课题组^[118]通过SPPS合成了S65位磷酸化的Ub, 然后二硫键连接cR10制备了磷酸化的CPP-Ub。他们成功地将该泛

素递送入活细胞, 还发现游离的磷酸化Ub并非是Parkin缀合形成多聚Ub链中的优选底物。为了提高Ub ABP对细胞的穿透能力, Brik课题组设计将4-((4-(二甲基氨基)苯基)偶氮)苯甲酸(4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid, DABCYL)与cR10融合, 并对Ub和SUMO-2进行穿膜, 发现相较于单独的cR10, DABCYL融合的cR10可以使Ub和SUMO-2穿膜能力提升3倍^[119-120]。细胞穿膜Ub ABP使研究完整细胞内DUB的活性成为可能, 这大大提升了对生理条件下DUB功能和调节机制的理解。

3.2 时间分辨穿膜Ub ABP

原位穿膜Ub ABP无法对DUBs的活性进行实时监测, 于是可控激活的时间分辨穿膜Ub ABP探针得到进一步发展。Brik课题组^[121]通过NCL与缩醛反应制备了带有细胞穿梭肽cR10的噻唑烷(thiazolidine, Thz)保护的Ubv2.3醛ABP(图24b)。该探针在穿透细胞膜进入细胞后, 不会与细胞内的DUBs发生反应。当在特定时间下使用细胞兼容的Pd试剂使Thz高效断裂后, 该探针暴露出C端的醛基, 发挥探针的功能作用。作者发现, 突变型Ubv2.3探针比天然Ub探针更能对USP2a产生抑制作用, 导致MDM2蛋白的水平下降。然而, 醛与DUB的反应是可逆的, 难以对细胞内DUBs的活性进行大规模筛查。Zhuang课题组^[122]利用氨解和二硫键连接反应开发了一种带有细胞穿梭肽cR10的四氮唑光笼HA-cR10-Ub-UM探针, 四氮唑弹头在光激活下可转化为胍亚胺结构, 从而被用于研究细胞周期不同阶段(G1/S期和G2/M期)的DUBs蛋白组学分析(图24c)。虽然上述发展的两种探针都能够实现Ub ABP在细胞内的可控激活, 然而它们的设计策略均是对Ub ABP活性基团的直接掩蔽, 这使得上述方法并不能广泛应用于其他类型Ub ABP的制备, 并且针对每一个反应探头都需要发展出对应的掩蔽策略, 这是非常耗时且困难的。近期, 本课题组^[123]通过SPPS和氨解反应发展了一种通用的方法——在Ub的Gly75的酰胺骨架上引入了一个光控的基团以产生位阻效应, 暂时阻碍Ub ABP与DUB活性中心的结合从而制备了活性掩蔽的cR10-Ub-PA探针(图24d)。当受到365 nm紫外光照射后, 掩蔽基团被脱除, 从而生成天然的Ub-PA探针并恢复与DUBs交联活性。运用该探针对HeLa细胞中的DUBs进行交联发现, 分布在细胞质(包括细胞膜、溶酶体、线粒体、内

质网、高尔基体)和细胞核中的29个DUBs被捕获,并且相较于上述两种探针,Ub-PA能够捕获更多的DUBs。此外,我们还将该策略进一步用于合成cR10-K48/K63-diUb-Dha探针,并实现了活细胞内K48 diUb特异性DUB OTUB1的功能研究。

CPP作为一种药物/蛋白质递送技术发展的重要工具,具有生物相容性高、细胞毒性小、入胞转运后可降解的优点^[124]。然而,其仍受到多方面因素的影响,例如蛋白质构象、表面电荷分布、疏水性等内在属性以及CPP的选择、连接linker等外在属性。2022年,Brik课题组^[125]通过化学方法制备了由两种CPPs(cR10和DABCYL修饰的cR10(cR10D))、两种连接linker(二硫键和马来酰亚胺)以及两种Ub构型(Lys48和Lys63)组合的8种CPP-diUb缀合物,以探测这些不同属性对蛋白

质细胞递送效果的影响。作者发现,相同cR10D下,二硫键连接的Lys48-diUb比Lys63-diUb穿膜效率更高。然而,二硫键替换为马来酰亚胺连接时,两种diUb的递送效果相似。此外,采用cR10时,二硫键连接的两种diUb的递送效果也相似。这说明了CPP、linker以及蛋白质的组合不同可能导致细胞递送效果不同。CPP技术更适用于小型蛋白质的递送,更大蛋白质的递送效果较差或不能穿膜。Hackenberger课题组^[126]以及Vallis课题组^[127]在细胞穿膜时添加富含巯基反应性精氨酸的肽或者添加三环的TAT提升了蛋白质的细胞摄取,使得150 ku免疫球蛋白G(IgG)抗体传递到活细胞中。然而,由于CPP介导的蛋白质递送缺乏细胞特异性和细胞器靶向性^[128],目前的应用仍受到一定的限制。

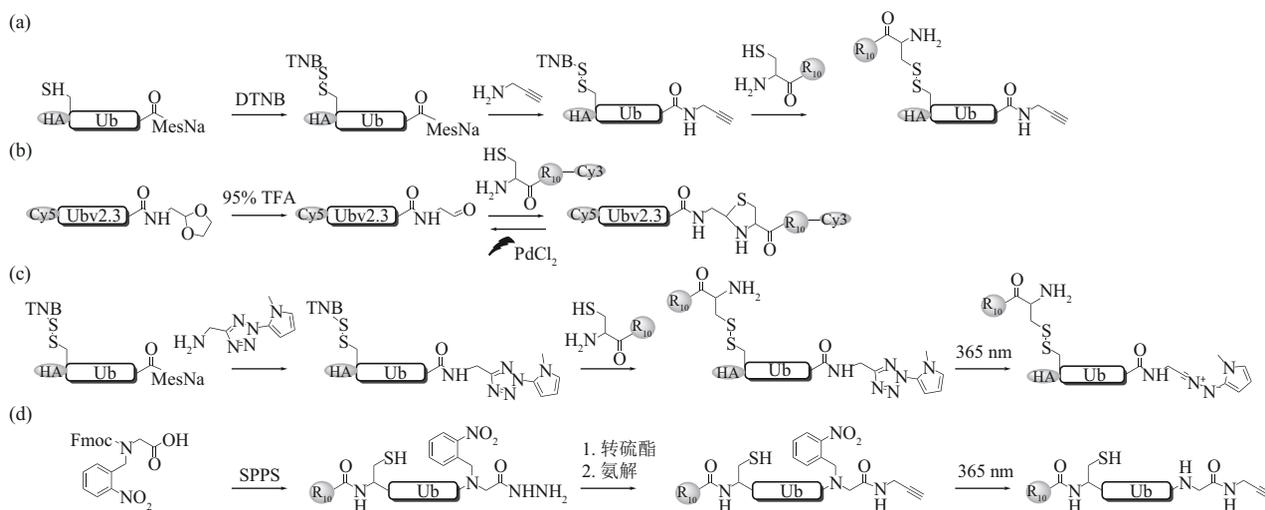


Fig. 24 Preparation of cell-permeable Ub ABP

图24 细胞穿梭型Ub ABP及其合成策略

(a) 原位穿膜Ub ABP; (b-d) 时间分辨穿膜Ub ABP。

4 总结与展望

本文回顾了近年来泛素探针的发展,包括作用于DUBs、E1s、E2s和E3s酶的泛素活性探针以及针对识别蛋白的泛素亲和性探针。还重点介绍了泛素及其缀合物的合成策略以及不同类别化学活性基团引入的策略。此外,总结了近年来涌现的一些细胞穿梭型泛素探针,这种类别的探针提供了一种在真实细胞环境中研究泛素化的方法,可以深入了解泛素化的动态变化、底物特异性和调控机制,然而其目前仍面临一些潜在挑战。譬如,目前开发的都

是针对DUB的泛素穿膜探针,作用于其他泛素酶的穿膜探针尚未开发出来。另外,特异性作用于某一目标蛋白的泛素穿膜探针亟待发展,这有助于对泛素化过程进行准确监测和研究,或将进一步帮助鉴定与泛素化异常相关的疾病。此外,确保泛素穿膜探针在细胞环境中的稳定性以避免被降解或失活也是一个重要的考虑因素,从而保证对监测结果的准确性。预计未来关于时间和空间分辨类的泛素探针将会得到进一步的发展,并有可能推动新型药物的发现。

参 考 文 献

- [1] Rape M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, **19**(1): 59-70
- [2] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**(1): 425-479
- [3] Berndsen C E, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, **21**(4): 301-307
- [4] Mabbitt P D, Loreto A, Déry M A, *et al.* Structural basis for RING-Cys-Relay E3 ligase activity and its role in axon integrity. *Nat Chem Biol*, 2020, **16**(11): 1227-1236
- [5] Mevissen T E T, Komander D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**: 159-192
- [6] Wang Y, Wang F. Post-translational modifications of deubiquitinating enzymes: expanding the ubiquitin code. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 685011
- [7] Haakonsen D L, Rape M. Branching out: improved signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends Cell Biol*, 2019, **29**(9): 704-716
- [8] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 203-229
- [9] Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem*, 2012, **81**: 291-322
- [10] Dikic I, Wakatsuki S, Walters K J. Ubiquitin-binding domains—from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(10): 659-671
- [11] Chen L, Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(13): 4902-4913
- [12] Wang B, Elledge S J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(52): 20759-20763
- [13] Henneberg L T, Schulman B A. Decoding the messaging of the ubiquitin system using chemical and protein probes. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(7): 889-902
- [14] Zheng Q, Su Z, Yu Y, *et al.* Recent progress in dissecting ubiquitin signals with chemical biology tools. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, **70**: 102187
- [15] Mulder M P C, Witting K F, Ovaa H. Cracking the ubiquitin code: the ubiquitin toolbox. *Curr Issues Mol Biol*, 2020, **37**(1): 1-20
- [16] Hewings D S, Flygare J A, Bogoy M, *et al.* Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights. *FEBS J*, 2017, **284**(10): 1555-1576
- [17] Sanman L E, Bogoy M. Activity-based profiling of proteases. *Annu Rev Biochem*, 2014, **83**: 249-273
- [18] Shi H, Zhang C J, Chen G Y J, *et al.* Cell-based proteome profiling of potential dasatinib targets by use of affinity-based probes. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(6): 3001-3014
- [19] Lam Y A, Xu W, DeMartino G N, *et al.* Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, 1997, **385**(6618): 737-740
- [20] Pickart C M, Rose I A. Mechanism of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Borohydride and hydroxylamine inactivate in the presence of ubiquitin. *J Biol Chem*, 1986, **261**(22): 10210-10217
- [21] Hershko A, Rose I A. Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(7): 1829-1833
- [22] Johnston S C, Riddle S M, Cohen R E, *et al.* Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J*, 1999, **18**(14): 3877-3887
- [23] Ekkebus R, van Kasteren S I, Kulathu Y, *et al.* On terminal alkynes that can react with active-site cysteine nucleophiles in proteases. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(8): 2867-2870
- [24] Gersch M, Gladkova C, Schubert A F, *et al.* Mechanism and regulation of the Lys6-selective deubiquitinase USP30. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(11): 920-930
- [25] Sahtoe D D, van Dijk W J, El Oualid F, *et al.* Mechanism of UCH-L5 activation and inhibition by DEUBAD domains in RPN13 and INO80G. *Mol Cell*, 2015, **57**(5): 887-900
- [26] Nair R M, Seenivasan A, Liu B, *et al.* Reconstitution and structural analysis of a HECT ligase-ubiquitin complex *via* an activity-based probe. *ACS Chem Biol*, 2021, **16**(9): 1615-1621
- [27] Borodovsky A, Kessler B M, Casagrande R, *et al.* A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J*, 2001, **20**(18): 5187-5196
- [28] Gao Y, Koppen A, Rakhshandehroo M, *et al.* Early adipogenesis is regulated through USP7-mediated deubiquitination of the histone acetyltransferase TIP60. *Nat Commun*, 2013, **4**(1): 2656
- [29] Borodovsky A, Ovaa H, Kolli N, *et al.* Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol*, 2002, **9**(10): 1149-1159
- [30] Love K R, Pandya R K, Spooner E, *et al.* Ubiquitin C-terminal electrophiles are activity-based probes for identification and mechanistic study of ubiquitin conjugating machinery. *ACS Chem Biol*, 2009, **4**(4): 275-287
- [31] Whedon S D, Markandeya N, Rana A S J B, *et al.* Selenocysteine as a latent bioorthogonal electrophilic probe for deubiquitylating enzymes. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(42): 13774-13777
- [32] Byrne R, Mund T, Licchesi J D F. Activity-based probes for HECT E3 ubiquitin ligases. *ChemBioChem*, 2017, **18**(14): 1415-1427
- [33] Horn-Ghetko D, Krist D T, Prabu J R, *et al.* Ubiquitin ligation to F-box protein targets by SCF-RBR E3-E3 super-assembly. *Nature*, 2021, **590**(7847): 671-676
- [34] Flierman D, Ekkebus R, Geurink P P, *et al.* Non-hydrolyzable diubiquitin probes reveal linkage-specific reactivity of deubiquitylating enzymes mediated by S2 pockets. *Cell Chem Biol*, 2016, **23**(4): 472-482
- [35] Mevissen T E T, Hospenthal M K, Geurink P P, *et al.* OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and

- enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell*, 2013, **154**(1): 169-184
- [36] Iphöfer A, Kummer A, Nimtz M, *et al.* Profiling ubiquitin linkage specificities of deubiquitinating enzymes with branched ubiquitin isopeptide probes. *ChemBioChem*, 2012, **13**(10): 1416-1420
- [37] McGouran J F, Gaertner S R, Altun M, *et al.* Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes. *Chem Biol*, 2013, **20**(12): 1447-1455
- [38] Li G, Liang Q, Gong P, *et al.* Activity-based diubiquitin probes for elucidating the linkage specificity of deubiquitinating enzymes. *Chem Commun*, 2014, **50**(2): 216-218
- [39] Haj-Yahya N, Hemantha H P, Meledin R, *et al.* Dehydroalanine-based diubiquitin activity probes. *Org Lett*, 2014, **16**(2): 540-543
- [40] Mulder M P C, El Oualid F, ter Beek J, *et al.* A native chemical ligation handle that enables the synthesis of advanced activity-based probes: diubiquitin as a case study. *ChemBioChem*, 2014, **15**(7): 946-949
- [41] Paudel P, Zhang Q, Leung C, *et al.* Crystal structure and activity-based labeling reveal the mechanisms for linkage-specific substrate recognition by deubiquitinase USP9X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(15): 7288-7297
- [42] Lu X, Olsen S K, Capili A D, *et al.* Designed semisynthetic protein inhibitors of Ub/Ubl E1 activating enzymes. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(6): 1748-1749
- [43] An H, Statsyuk A V. Facile synthesis of covalent probes to capture enzymatic intermediates during E1 enzyme catalysis. *Chem Commun*, 2016, **52**(12): 2477-2480
- [44] Borodovsky A, Ovaia H, Meester W J N, *et al.* Small-molecule inhibitors and probes for ubiquitin-and ubiquitin-like-specific proteases. *ChemBioChem*, 2005, **6**(2): 287-291
- [45] Pao K C, Stanley M, Han C, *et al.* Probes of ubiquitin E3 ligases distinguish different stages of Parkin activation. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(5): 324
- [46] Pao K C, Wood N T, Knebel A, *et al.* Activity-based E3 ligase profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nature*, 2018, **556**(7701): 381-385
- [47] Xu L, Fan J, Wang Y, *et al.* An activity-based probe developed by a sequential dehydroalanine formation strategy targets HECT E3 ubiquitin ligases. *Chem Commun*, 2019, **55**(49): 7109-7112
- [48] Liang L J, Chu G C, Qu Q, *et al.* Chemical synthesis of activity-based E2-ubiquitin probes for the structural analysis of E3 ligase-catalyzed transthiolation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(31): 17171-17177
- [49] Mathur S, Fletcher A J, Branigan E, *et al.* Photocrosslinking activity-based probes for ubiquitin RING E3 ligases. *Cell Chem Biol*, 2020, **27**(1): 74-82
- [50] Mulder M P C, Witting K, Berlin I, *et al.* A cascading activity-based probe sequentially targets E1-E2-E3 ubiquitin enzymes. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(7): 523-530
- [51] Murale D P, Hong S C, Haque M M, *et al.* Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs). *Proteome Sci*, 2016, **15**: 1-34
- [52] Braxton C N, Quartner E, Pawloski W, *et al.* Ubiquitin chains bearing genetically encoded photo-cross-linkers enable efficient covalent capture of (poly) ubiquitin-binding domains. *Biochemistry*, 2019, **58**(7): 883-886
- [53] Liang J, Zhang L, Tan X L, *et al.* Chemical synthesis of diubiquitin-based photoaffinity probes for selectively profiling ubiquitin-binding proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **129**(10): 2788-2792
- [54] Chojnacki M, Mansour W, Hameed D S, *et al.* Polyubiquitin-photoactivatable crosslinking reagents for mapping ubiquitin interactome identify Rpn1 as a proteasome ubiquitin-associating subunit. *Cell Chem Biol*, 2017, **24**(4): 443-457
- [55] Zhou L, Holt M T, Ohashi N, *et al.* Evidence that ubiquitylated H2B corrals hDot1L on the nucleosomal surface to induce H3K79 methylation. *Nat Commun*, 2016, **7**(1): 10589
- [56] Merrifield R B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 1963, **85**(14): 2149-2154
- [57] Dawson P E, Kent S B H. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**(1): 923-960
- [58] Dawson P E, Muir T W, Clark-Lewis I, *et al.* Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 1994, **266**(5186): 776-779
- [59] Fang G M, Li Y M, Shen F, *et al.* Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **33**(50): 7645-7649
- [60] Fang G M, Wang J X, Liu L. Convergent chemical synthesis of proteins by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(41): 10347-10350
- [61] Huang Y C, Li Y M, Chen Y, *et al.* Synthesis of autophagosomal marker protein LC3-II under detergent-free conditions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(18): 4858-4862
- [62] Zheng J S, Tang S, Qi Y K, *et al.* Chemical synthesis of proteins using peptide hydrazides as thioester surrogates. *Nat Protoc*, 2013, **8**(12): 2483-2495
- [63] Li Y M, Li Y T, Pan M, *et al.* Irreversible site-specific hydrazinolysis of proteins by use of sortase. *Angew Chem*, 2014, **126**(8): 2230-2234
- [64] Wang J X, Fang G M, He Y, *et al.* Peptide o-aminoanilides as crypto-thioesters for protein chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(7): 2194-2198
- [65] Tang S, Si Y Y, Wang Z P, *et al.* An efficient one-pot four-segment condensation method for protein chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(19): 5713-5717
- [66] Li Y, Heng J, Sun D, *et al.* Chemical synthesis of a full-length G-protein-coupled receptor β 2-adrenergic receptor with defined modification patterns at the C-terminus. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(42): 17566-17576
- [67] Ai H, Sun M, Liu A, *et al.* H2B Lys34 ubiquitination induces nucleosome distortion to stimulate Dot1L activity. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**(9): 972-980
- [68] Ai H, Chu G C, Gong Q, *et al.* Chemical synthesis of post-translationally modified H2AX reveals redundancy in interplay between histone phosphorylation, ubiquitination, and methylation

- on the binding of 53BP1 with nucleosomes. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(40): 18329-18337
- [69] Pan M, Zheng Q, Wang T, *et al.* Structural insights into Ubr1-mediated N-degron polyubiquitination. *Nature*, 2021, **600**(7888): 334-338
- [70] Yu Y, Zheng Q, Erramilli S K, *et al.* K29-linked ubiquitin signaling regulates proteotoxic stress response and cell cycle. *Nat Chem Biol*, 2021, **17**(8): 896-905
- [71] Kumar K S A, Spasser L, Erlich L A, *et al.* Total chemical synthesis of di-ubiquitin chains. *Angew Chem*, 2010, **122**(48): 9312-9317
- [72] El Oualid F, Merckx R, Ekkebus R, *et al.* Chemical synthesis of ubiquitin, ubiquitin-based probes, and diubiquitin. *Angew Chem*, 2010, **122**(52): 10347-10351
- [73] Muir T W, Sondhi D, Cole P A. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(12): 6705-6710
- [74] Shi J, Muir T W. Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(17): 6198-6206
- [75] Adams A L, Cowper B, Morgan R E, *et al.* Cysteine promoted C-terminal hydrazinolysis of native peptides and proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52**(49): 13062-13066
- [76] Chu G C, Pan M, Li J, *et al.* Cysteine-aminoethylation-assisted chemical ubiquitination of recombinant histones. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(8): 3654-3663
- [77] Zheng Q, Wang T, Chu G C, *et al.* An E1-catalyzed chemoenzymatic strategy to isopeptide-N-ethylated deubiquitylase-resistant ubiquitin probes. *Angew Chem*, 2020, **132**(32): 13598-13603
- [78] Piotukh K, Geltinger B, Heinrich N, *et al.* Directed evolution of sortase A mutants with altered substrate selectivity profiles. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(44): 17536-17539
- [79] Bierlmeier J, Álvaro-Benito M, Scheffler M, *et al.* Sortase-mediated multi-fragment assemblies by ligation site switching. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(5): e202109032
- [80] Zuo C, Ding R, Wu X, *et al.* Thioester-assisted sortase-A-mediated ligation. *Angew Chem*, 2022, **134**(28): e202201887
- [81] Chatterjee C, McGinty R K, Pellois J P, *et al.* Auxiliary-mediated site-specific peptide ubiquitylation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, **46**(16): 2814-2818
- [82] Pan M, Gao S, Zheng Y, *et al.* Quasi-racemic X-ray structures of K27-linked ubiquitin chains prepared by total chemical synthesis. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(23): 7429-7435
- [83] Weller C E, Huang W, Chatterjee C. Facile synthesis of native and protease-resistant ubiquitylated peptides. *ChemBioChem*, 2014, **15**(9): 1263-1267
- [84] Yang R, Pasunooti K K, Li F, *et al.* Dual native chemical ligation at lysine. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(38): 13592-13593
- [85] Yang R, Pasunooti K K, Li F, *et al.* Synthesis of K48-linked diubiquitin using dual native chemical ligation at lysine. *Chem Commun*, 2010, **46**(38): 7199-7201
- [86] Ajish Kumar K S, Haj-Yahya M, Olschewski D, *et al.* Highly efficient and chemoselective peptide ubiquitylation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**: 8090-8094
- [87] Kumar K S A, Spasser L, Erlich L A, *et al.* Total chemical synthesis of di-ubiquitin chains. *Angew Chem*, 2010, **122**(48): 9312-9317
- [88] Kumar K S A, Bavikar S N, Spasser L, *et al.* Total chemical synthesis of a 304 amino acid K48-linked tetraubiquitin protein. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(27): 6137-6141
- [89] Merckx R, de Bruin G, Kruijthof A, *et al.* Scalable synthesis of γ -thiolysine starting from lysine and a side by side comparison with δ -thiolysine in non-enzymatic ubiquitination. *Chem Sci*, 2013, **4**(12): 4494-4498
- [90] Tang S, Liang L J, Si Y Y, *et al.* Practical chemical synthesis of atypical ubiquitin chains by using an isopeptide-linked Ub isomer. *Angew Chem*, 2017, **129**(43): 13518-13522
- [91] Virdee S, Kapadnis P B, Elliott T, *et al.* Traceless and site-specific ubiquitination of recombinant proteins. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(28): 10708-10711
- [92] Virdee S, Ye Y, Nguyen D P, *et al.* Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nat Chem Biol*, 2010, **6**(10): 750-757
- [93] Castañeda C, Liu J, Chaturvedi A, *et al.* Nonenzymatic assembly of natural polyubiquitin chains of any linkage composition and isotopic labeling scheme. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(44): 17855-17868
- [94] Yang R, Bi X, Li F, *et al.* Native chemical ubiquitination using a genetically incorporated azidonorleucine. *Chem Commun*, 2014, **50**(59): 7971-7974
- [95] Xu L, Huang J F, Chen C C, *et al.* Chemical synthesis of natural polyubiquitin chains through auxiliary-mediated ligation of an expressed ubiquitin isomer. *Org Lett*, 2018, **20**(2): 329-332
- [96] Chatterjee C, McGinty R K, Fierz B, *et al.* Disulfide-directed histone ubiquitylation reveals plasticity in hDot1L activation. *Nat Chem Biol*, 2010, **6**(4): 267-269
- [97] Chen J, Ai Y, Wang J, *et al.* Chemically ubiquitylated PCNA as a probe for eukaryotic translesion DNA synthesis. *Nat Chem Biol*, 2010, **6**(4): 270-272
- [98] Valkevich E M, Guenette R G, Sanchez N A, *et al.* 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**(16): 6916-6919
- [99] Trang V H, Valkevich E M, Minami S, *et al.* Nonenzymatic polymerization of ubiquitin: single-step synthesis and isolation of discrete ubiquitin oligomers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(52): 13085-13088
- [100] Yin L, Krantz B, Russell N S, *et al.* Nonhydrolyzable diubiquitin analogues are inhibitors of ubiquitin conjugation and deconjugation. *Biochemistry*, 2000, **39**(32): 10001-10010
- [101] Morgan M T, Haj-Yahya M, Ringel A E, *et al.* Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. *Science*, 2016, **351**(6274): 725-728
- [102] Lewis Y E, Abeywardana T, Lin Y H, *et al.* Synthesis of a bis-thioacetone (BTA) analogue of the lysine isopeptide bond and its

- application to investigate the effects of ubiquitination and SUMOylation on α -synuclein aggregation and toxicity. *ACS Chem Biol*, 2016, **11**(4): 931-942
- [103] Chu G C, Zhao R, Wu X, *et al.* One-pot synthesis of a bis-thioacetone linked ubiquitinated histones using 1,3-dibromoacetone. *J Org Chem*, 2020, **85**(23): 15631-15637
- [104] Eger S, Scheffner M, Marx A, *et al.* Synthesis of defined ubiquitin dimers. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(46): 16337-16339
- [105] Weikart N D, Sommer S, Mootz H D. Click synthesis of ubiquitin dimer analogs to interrogate linkage-specific UBA domain binding. *Chem Commun*, 2012, **48**(2): 296-298
- [106] Ye Y, Wu X, Chu G C, *et al.* Semi-synthesis of K27-linked-mixed-triubiquitin chains through a combination of enzymatic reaction with CAACU strategy. *Tetrahedron Lett*, 2021, **71**: 153000
- [107] Zheng Q, Wang T, Mao J, *et al.* A bifunctional molecule-assisted synthesis of mimics for use in probing the ubiquitination system. *Nat Protoc*, 2023, **18**(2): 530-554
- [108] Hemantha H P, Bavikar S N, Herman-Bachinsky Y, *et al.* Nonenzymatic polyubiquitination of expressed proteins. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(6): 2665-2673
- [109] Singh S K, Sahu I, Mali S M, *et al.* Synthetic uncleavable ubiquitinated proteins dissect proteasome deubiquitination and degradation, and highlight distinctive fate of tetraubiquitin. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(49): 16004-16015
- [110] Tan X, Bai J, Ding S, *et al.* Semi-synthesis of ubiquitin-propargylamide for identifying deubiquitinase targeting inhibitors. *Chinese Chem Lett*, 2019, **30**(3): 743-746
- [111] Wang Y, Chen C, Meng X, *et al.* Chemical synthesis of diSUMO photoaffinity probes for the identification of polySUMO chain-specific interacting proteins. *CCS Chem*, 2021, **3**(4): 1157-1168
- [112] Shen S, Davidson G A, Yang K, *et al.* Photo-activatable Ub-PCNA probes reveal new structural features of the *Saccharomyces cerevisiae* Polh/PCNA complex. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(16): 9374-9388
- [113] Tang J, Shu Q, Guo Y, *et al.* Cell-permeable ubiquitin and histone tools for studying post-translational modifications. *ChemBioChem*, 2023: e202300169
- [114] Sui X, Wang Y, Du Y X, *et al.* Development and application of ubiquitin-based chemical probes. *Chem Sci*, 2020, **11**(47): 12633-12646
- [115] Hecce H D, Schumacher D, Schneider A F L, *et al.* Cell-permeable nanobodies for targeted immunolabelling and antigen manipulation in living cells. *Nat Chem*, 2017, **9**(8): 762-771
- [116] Schneider A F L, Kithil M, Cardoso M C, *et al.* Cellular uptake of large biomolecules enabled by cell-surface-reactive cell-penetrating peptide additives. *Nat Chem*, 2021, **13**(6): 530-539
- [117] Gui W, Ott C A, Yang K, *et al.* Cell-permeable activity-based ubiquitin probes enable intracellular profiling of human deubiquitinases. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(39): 12424-12433
- [118] Mann G, Satish G, Sulkshane P, *et al.* Synthesis and delivery of a stable phosphorylated ubiquitin probe to study ubiquitin conjugation in mitophagy. *Chem Commun*, 2021, **57**(74): 9438-9441
- [119] Mandal S, Mann G, Satish G, *et al.* Enhanced live-cell delivery of synthetic proteins assisted by cell-penetrating peptides fused to DABCYL. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(13): 7333-7343
- [120] Saha A, Mandal S, Arafilis J V V, *et al.* Structure-uptake relationship study of DABCYL derivatives linked to cyclic cell-penetrating peptides for live-cell delivery of synthetic proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(47): e202207551
- [121] Mann G, Satish G, Meledin R, *et al.* Palladium-mediated cleavage of proteins with thiazolidine-modified backbone in live cells. *Angew Chem*, 2019, **58**(38): 13540-13549
- [122] Gui W, Shen S, Zhuang Z. Photocaged cell-permeable ubiquitin probe for temporal profiling of deubiquitinating enzymes. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(46): 19493-19501
- [123] Wang Y, Chen J, Hua X, *et al.* Photocaging of activity-based ubiquitin probes via a C-terminal backbone modification strategy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(28): e202203792
- [124] Allen J K, Sutherland T C, Prater A R, *et al.* *In vivo* peptide-based delivery of a gene-modifying enzyme into cells of the central nervous system. *Sci Adv*, 2022, **8**(39): eabo2954
- [125] Mandal S, Brik A. Probing the cell delivery of synthetic diubiquitin chains. *Chem Commun*, 2022, **58**(63): 8782-8785
- [126] Schneider A F L, Kithil M, Cardoso M C, *et al.* Cellular uptake of large biomolecules enabled by cell-surface-reactive cell-penetrating peptide additives. *Nat Chem*, 2021, **13**(6): 530-539
- [127] Tietz O, Cortezon-Tamarit F, Chalk R, *et al.* Tricyclic cell-penetrating peptides for efficient delivery of functional antibodies into cancer cells. *Nat Chem*, 2022, **14**(3): 284-293
- [128] Schneider A F L, Wallabregue A L D, Franz L, *et al.* Targeted subcellular protein delivery using cleavable cyclic cell-penetrating peptides. *Bioconjug Chem*, 2019, **30**(2): 400-404

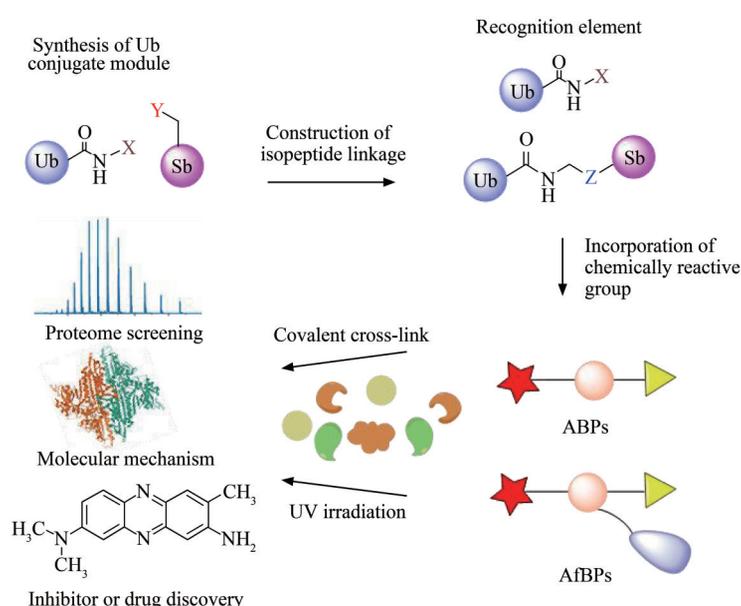
Development and Synthesis of Activity-based and Affinity-based Ubiquitin Probes*

XU Ling¹⁾, WEI Cui-Na¹⁾, LU Xian-Fu^{1)**}, LI Yi-Ming^{2)**}

¹⁾The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China;

²⁾Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Graphical abstract



Abstract Ubiquitination, a diverse post-translational modification, is carried out by enzymes including E1-activating enzymes, E2-conjugating enzymes, E3 ligases, and deubiquitinating enzymes (DUBs). Ubiquitin itself possesses 7 lysine residues and N-terminal methionine, allowing for the formation of polyubiquitin chains with different lengths and linkages. These chains exhibit various topologies that can be recognized by proteins containing ubiquitin-binding domain, thereby transmitting distinct cellular signals. To unravel the physiological mechanisms associated with ubiquitin, numerous ubiquitin probes have been developed. This review provides an overview of recent advancements in the field of ubiquitin probes, focusing on activity-based and affinity-based probes. Activity-based probes are designed to covalently bind to DUBs, E1s, or E3s, enabling the identification

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (22207001, 22277020) and Natural Science Foundation of Anhui Province (2208085QC74).

** Corresponding author.

LI Yi-Ming. Tel: 86-13705518072, E-mail: ymli@hfut.edu.cn

LU Xian-Fu. Tel: 86-13866112467, E-mail: Ahluxianfu@163.com

Received: April 3, 2023 Accepted: June 18, 2023

and characterization of these enzymes. Affinity-based probes, on the other hand, selectively bind to ubiquitin-binding domains, facilitating the identification of proteins that interact with ubiquitin. Moreover, this review comprehensively discusses the synthetic methodologies employed for the acquisition of ubiquitin probes. These includes meticulous discussions on the synthesis of individual monomeric modules, the establishment of isopeptide linkages, as well as the incorporation of reactive functional groups. Additionally, the review explores the emerging area of cell-penetrating ubiquitin probes and highlights their latest applications in living cells. These probes incorporate cell-penetrating peptides to enable their internalization into cells, allowing for direct visualization and manipulation of ubiquitin-modified proteins within their native environment. Overall, this review offers insights into the design, synthesis, and applications of ubiquitin probes, highlighting their significance in elucidating ubiquitin-mediated cellular processes.

Key words ubiquitin, activity, affinity, probe, chemical synthesis

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0119