

磷酸化组氨酸研究进展*

王志鹏²⁾ 陈晨晨¹⁾ 王田³⁾ 王淼²⁾ 李宜明^{1, 2)**}

(¹⁾ 合肥工业大学医学工程学院, 合肥 230009; (²⁾ 清华大学化学系, 北京 100084; (³⁾ 清华大学生命学院, 北京 100084)

摘要 蛋白质磷酸化是生物体内一种广泛存在的蛋白质翻译后修饰形式, 这种氨基酸与磷酸基团共价连接的修饰模式对蛋白质结构和功能起到了重要调节作用。目前天然蛋白质中发现的可磷酸化位点主要有 9 种氨基酸残基, 其中包括以磷酸胺连接的磷酸化组氨酸。虽然该磷酸化形式在原核生物与真核生物中都起到了重要的调节作用, 但对于其生物学功能的研究长期存在技术困难。由于磷酸化组氨酸本身不同于其他磷酸化氨基酸的化学性质, 如存在异构体、化学不稳定等, 其在传统的研究方法中容易发生水解去磷酸化。随着现代生物化学与分子生物学技术的不断进步, 人们针对含有磷酸化组氨酸的蛋白质构建了新的制备、分离与表征策略, 本领域也因此开始迅速发展。本文从磷酸化组氨酸的化学结构入手, 分析其两种异构体的主要理化性质与化学反应特性, 并概述了基于此发展的新型化学生物学研究手段以及对于磷酸化组氨酸生物功能的研究进展。

关键词 磷酸化组氨酸, 蛋白质翻译后修饰, 磷酸化, 蛋白质激酶

学科分类号 O629.73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00247

蛋白质磷酸化的相关研究起步于 20 世纪初。尽管 Levene 等^[1]早在 1906 年就发现卵黄素蛋白中存在磷酸基团, 但直到 1932 年他们^[2]才鉴定出该磷酸基团是磷酸化的丝氨酸。此后, 一系列磷酸化氨基酸得到验证, 包括 9 种天然氨基酸(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和组氨酸)与羟脯氨酸。磷酸化主要包含 4 种模式, 即 O-磷酸化、N-磷酸化、S-磷酸化和酰基磷酸化。其中磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸与磷酸化酪氨酸已被广泛研究(图 1)。它们在细胞代谢与调控中起到了重要的作用^[3]。但是, 其他一些磷酸化氨基酸无论从含量或者功能上都不可忽视, 磷酸化组氨酸就是一个重要代表。

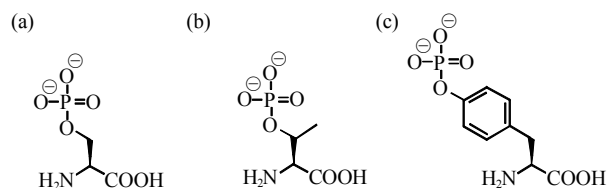


Fig. 1 Three major phosphorylated amino acids

图 1 三种主要的磷酸化氨基酸

(a) 磷酸化丝氨酸. (b) 磷酸化苏氨酸. (c) 磷酸化酪氨酸.

磷酸化组氨酸是一种广泛存在的磷酸化氨基酸, 据估计其在真核细胞内含量虽然不及磷酸化丝氨酸, 却是磷酸化酪氨酸的数十倍^[4]。而且 N—P 共价键的特异性导致磷酸化组氨酸有多种不同于 O—P 共价键连接的磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸或磷酸化酪氨酸的化学性质。同时, 蛋白质中组氨酸残基的磷酸化也是一种调节细胞内蛋白质功能的重要方式^[5]。本文将从磷酸化组氨酸的发现与发展历史出发, 总结其相关生物化学性质的研究, 并进一步综述该修饰后氨基酸生理功能的相关研究。

1 发现历史

磷酸化组氨酸最早由 Severin 等^[6]于 1947 年实现化学合成。1963 年, Boyer 小组^[7]才在线粒体蛋白质的研究中完成其生化检验。人们最初认识到磷酸化组氨酸可能是一个磷酸化酶的中间体状态, 而

* 国家自然科学基金资助项目(21102083)。

** 通讯联系人。

Tel: 13705518072, E-mail: lym2007@mail.ustc.edu.cn

收稿日期: 2013-06-06, 接受日期: 2013-08-19

该步骤是某些酶催化过程所必需的. 随着研究的深入, 人们逐渐发现磷酸化组氨酸是一种广泛存在于生物界的信号调节方式^[8]. 1994年, Simon等^[9]报道了原核生物细菌中基于组氨酸磷酸化酶的“双组分”信号传递系统; 1993年, 报道了酵母^[10]中的同源序列蛋白质 SLN1 与 SSK1^[11]. 2000年, Muimo 研究组^[12]发现, 绵羊气管上皮细胞体系中钙离子依赖性磷酸结合蛋白 annexin I 存在组氨酸磷酸化现象. γ -³²P 标记的 ATP 和 GTP 及相关磷酸化氨基酸生化分析证明了这一结论. 这一磷酸化过程进一步导致 annexin I 下游的信号传递. 因而, 这个工作证明了组氨酸磷酸化在哺乳动物细胞信号传递过程中的重要作用.

另一方面, 人们也在探索磷酸化过程的逆过程, 即去磷酸化过程. 在细菌中, 很多磷酸化酶本身也具有去磷酸化作用. Mizuno 小组^[13]报道了第一个大肠杆菌中的磷酸化组氨酸去磷酸化酶

SixA. 该酶是 ArcB 信号通路的一个重要调节因子. 此后, 人们在哺乳动物细胞中也发现了许多磷酸化组氨酸去磷酸化酶^[14], 而且它们具有各自不同的功能^[15]. 另外, 其他一些氨基酸残基的激酶也被报道利用磷酸化组氨酸作为中间体^[16]. 这些信号通路与某些人体生理及病理状态直接相关, 例如组蛋白上组氨酸的磷酸化与基因转录与表达直接相关^[17], 这些去磷酸化酶也因而成为潜在的药物靶点^[18].

2 化学结构与命名法

人们对磷酸化组氨酸结构的研究持续了很长时间. 磷酸化组氨酸在生物体内存在两种异构体, 二者的差别在于咪唑环上磷酸化的位点不同(图 2). 这一特性与其他所有的磷酸化氨基酸都有区别. 另外, 人们还化学合成了 1, 3- 二磷酸化组氨酸, 但是其并没有在生物体系中被发现^[19].

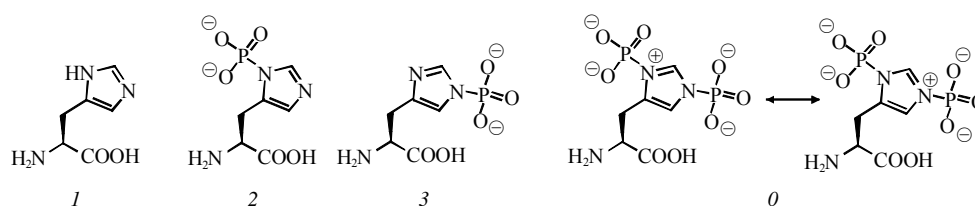


Fig. 2 Structures of histidine and phosphohistidine

图 2 组氨酸与磷酸化组氨酸的结构式

1: 组氨酸; 2: π -磷酸组氨酸; 3: τ -磷酸组氨酸, 均存在于生物体中; 0: 1, 3-二磷酸化组氨酸, 在生物体中未被发现.

值得注意的是, 对于磷酸化组氨酸两种异构体的命名一直都存在分歧. 长久以来, 大部分对于磷酸化组氨酸报道的文献中都将异构体 3 称为 3-磷酸组氨酸^[20]. 然而, 基于对于咪唑环的传统编号命名法, 也有文献^[21]将异构体 3 称为 1-磷酸组氨酸. 除此之外, Delbaere 等^[22]在蛋白质晶体学的研究报告中还将 2 和 3 两个异构体分别称作 N δ 1 位磷酸化和 N ϵ 2 位磷酸化的组氨酸.

为了避免类似的命名差异, 国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)以及国际生化联合会(IUB)联合发表了关于含有磷酸基团的众多生物分子的推荐命名法, 其中便包含了这一对异构体^[23]. 在该命名法中, 异构体 2 被称为 3(1)-磷酸组氨酸, 而异构体 3 被称为 1(3)-磷酸组氨酸, 同时, 词头由“phosphor”改为“phosphono”以表示离子状态. 此外, 该命名法还推荐将异构体 2 称为 π -磷酸组氨酸或 *pros*-磷酸组氨酸, 而异构体 3 称为 τ -磷酸

组氨酸或 *tele*-磷酸组氨酸.

3 主要生物化学性质

3.1 化学不稳定性

由于磷酸化组氨酸本身的化学不稳定性, 其在生物体内研究的报道相对于其他磷酸化氨基酸的报道一直较少. 从热力学角度看, 磷酸化组氨酸中磷酸基团与咪唑环上的 N 原子连接形成磷酰胺结构. 磷酰胺键本身是不够稳定的, 这是由于磷酰胺结构中的 P—N 化学键水解过程的自由能变化(水解过程的标准吉布斯自由能变约为 $-12 \sim -14$ kcal/mol)较磷酸酯结构(磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸、磷酸化酪氨酸)中的 P—O 化学键水解过程(水解过程的标准吉布斯自由能变约为 $-6.5 \sim -9.5$ kcal/mol)的自由能变化大了不少^[24]. 从动力学的角度看, 磷酸化组氨酸对酸较为敏感, 而其他通过磷酸酯连接的磷酸化氨基酸对酸较为稳定^[25]. 实验表明, 1 mol/L

盐酸溶液在 100℃ 条件下, 游离的磷酸化丝氨酸、磷酸化苏氨酸的半衰期约为 18 h, 而磷酸化酪氨酸约为 5 h. 1 mol/L 盐酸溶液在 49℃ 条件下, 游离的磷酸化组氨酸半衰期也只有数十秒. 尽管两种磷酸化组氨酸的异构体都很容易在酸性溶液中发生去磷酸化, 二者的热力学稳定性是有所区别的. π -磷酸组氨酸相比于 τ -磷酸组氨酸不稳定, 因此水解也就更快. 而 π -磷酸组氨酸和 τ -磷酸组氨酸的稳定性差异被认为是 N 原子上磷酸基团与质子化的 α -氨基的空间距离不同所致^[26].

3.2 含有磷酸化组氨酸蛋白的制备及异构体的形成与转化

为了研究磷酸化组氨酸在蛋白质调控中的作用, 我们需要首先制备含有磷酸化组氨酸的蛋白, 同时也可以将此作为正对照组. 方法一, 最直接的方法是磷酸激酶磷酸化法. 通过酶法进行磷酸化可以实现在组氨酸特定位点的选择性磷酸化, 但是只对特定酶识别的底物有效. 例如酶法制备的组蛋白 H4 已经被广泛地应用在生化实验中^[27]. 方法二, 选择性的化学磷酸化也是一种常用的方法^[28], 即利用磷酸胺钾盐在 pH 7~8 的条件下处理蛋白质, 便可以高产率地实现组氨酸磷酸化, 其他各类氨基酸残基并不会被磷酸化. 需要注意的是, 在此反应中, π -磷酸组氨酸是动力学优势的产物. 而随着反应的进行, 热力学较为稳定的 τ -磷酸组氨酸会逐渐成为优势产物. 虽然通过色谱可以将两种异构体分离, 但是通过化学方法得到纯净的 π -磷酸组氨酸还是一个挑战.

最近, König 小组^[29]报道了利用磷酸胺基钾 (PPA) 作为磷酸化试剂直接修饰天然蛋白质的工作. 对于含有多个组氨酸残基的模型蛋白, 该处理法将得到一系列不同数目的组氨酸磷酸化产物. 他们利用生化手段进行了表征. PPA 对所有测试的蛋白质都适用, 而且还能保证其三级结构的完整性. 另外, π -磷酸组氨酸即便在温和的碱性溶液中也缓慢地转化为 τ -磷酸组氨酸^[26], 这一情况同样可能发生在分离与鉴定过程中, 因而我们可以猜想从生物体内提取分离的 τ -磷酸组氨酸可能有一部分由 π -磷酸组氨酸转化而来.

4 磷酸化组氨酸及其相关蛋白质的研究方法

由于磷酸化组氨酸具有酸不稳定性, 因此传统的鉴定分离方法不太实用. 相反, 磷酸化组氨酸具有碱稳定性, 即便在强碱的热溶液中也不降解. 而

这样的条件可以将磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸等分解. 这归因于磷酸胺与磷酸酯化学性质的差别.

4.1 生化技术与分析化学技术

用非特异性蛋白酶处理磷酸化蛋白可以将其降解为相应多肽片段. 可以用反相薄层层析法 (RP-TLC) 进行鉴定, 用反相电泳、反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 等进行分离. 质谱或者串联质谱 (MS/MS) 也已广泛用于磷酸化蛋白的分析^[28]. 需要特别注意的是, 液相色谱的流动相如果含有酸性成分可能使其分解, 而且质谱分析中的正离子检测模式也可能使得磷酸化组氨酸脱去磷酸基团. 为了克服这一技术挑战, 人们做了很多相关探索. Ross 小组^[30]以已知的磷酸化蛋白 HPr 为例, 对样品制备、亲和分离及质谱技术进行了系统性研究. 近期又有一些新的技术进展^[31]. 另外, 由于自然条件下丰度最高的同位素 ^{31}P 具有很强的核磁共振信号, 因而核磁共振磷谱 (^{31}P NMR) 长期被用作一种磷酸化蛋白质的分析手段^[32]. 自从 Gassner 等^[33]于 1977 年报道了首个 τ -磷酸组氨酸与 π -磷酸组氨酸 ^1H 与 ^{31}P NMR 的精细数据以来, 人们已经将这一研究手段拓展到鉴定蛋白质中的磷酸化组氨酸异构体的研究中^[34].

同时, 人们也发展了相应的生化技术来研究直接提取含有磷酸化组氨酸的蛋白质. 由于磷酸化蛋白质在体内的含量很低, 首先需要对其进行富集. 磷酸化蛋白质组学为此提供了具体的研究方法并取得了重要的突破^[35], 人们考虑借鉴其他磷酸化氨基酸的类似研究思路用免疫亲和色谱或者固定金属亲和色谱 (IMAC) 进行研究. 例如 Napper 与其合作者^[36]通过固定的铜离子 (II) 亲和色谱富集分离了含磷酸化组氨酸的多肽, 并用 MALDI-TOF 质谱进行了研究.

此外, 人们还发展了带有荧光基团或者生物素标记的分子工具用于相关研究. 最近, Carlson 等^[37]设计并合成了荧光基团 -ATP 类似物相连的分子 (BODIPY-FL-ATP- γ S). 由于其可以与组氨酸激酶 (HK) 的 ATP 结合位点相结合, 因而可以被作为一种新型策略用于二组分系统的功能研究或者抑制剂筛选. Boon 小组^[38]还设计并合成了 ATP- γ -Biotin-LC-PEO-胺分子, 他们发现该分子可以作为一种生物素标记的激酶底物. 该分子工具可以用于对包括组氨酸磷酸化激酶或含磷酸化组氨酸蛋白的蛋白质磷酸化研究.

4.2 磷酸化组氨酸类似物

基于磷酸化组氨酸本身的不稳定性, 人们考虑设计合成一些类似物进行模拟. 方法一, Lasker 等^[39]的研究表明, 含有硫代磷酸化组氨酸(tpHis)的多肽甚至在 pH 为 0 的溶液里 3 h 都保持稳定. 这正由于硫原子的电负性与吸电子能力相对于氧原子都要低一些, 该类似物的酸性水解稳定性得到提高. tpHis(图 3, 4)可以很容易地从组氨酸化学合成得到; 利用组氨酸激酶可以直接将 ATP γ S 选择性连接到组氨酸残基上^[40], 这一酶法的制备策略早已在其他磷酸化氨基酸的类似物合成中使用过^[41]. 方法二, 将易水解的磷酸酯键直接转化为难以分解的 C—P 共价键也是一种很自然的类似物设计法, 而且也被多次用于其他磷酸化氨基酸类似物的设计

中^[42]. 首先, 人们发展了将二唑环改造为其他杂环类似物的策略, 例如咪唑环(图 3, 5)^[21]、吡咯环(图 3, 6)^[43]和三唑环^[44](图 3, 7, 8); 其次, 人们还设计磷酸基团本身的类似物以实现将易水解的 P—N 键替代为 C—N 键的目的, 例如丙二酸酯衍生物^[45](图 3, 9~12). 此外, Hedberg 等^[46]报道了以 C—S 共价键进一步替换 C—P 共价键得到的类似物(图 3, 13). 他们将其用于 Fmoc- 固相合成中, 并用合成的多肽作抑制剂对组氨酸去磷酸化酶进行结合蛋白捕获(pull-down)实验. 特别是, 这种磺酰胺类类似物的氨基被认为可以模拟磷酸基团水解的过渡态. 同样利用铜离子催化的 Click 反应, Brimble 等^[47]还发展了一种新型的三唑丙氨酸模拟物(图 3, 14), 并将其用于多肽合成.

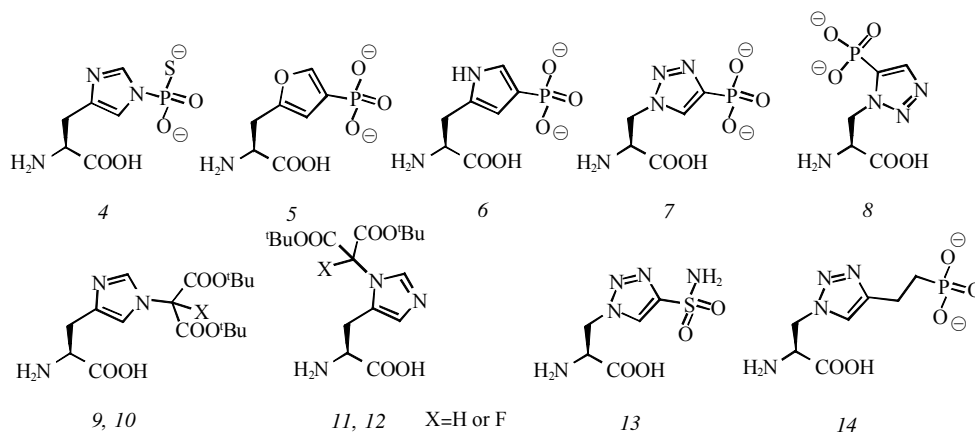


Fig. 3 Structures of phosphohistidine analogs

图 3 磷酸化组氨酸类似物的结构式

4~7, 9, 10, 13, 14 是 τ -磷酸组氨酸类似物; 8, 11, 12 是 π -磷酸组氨酸类似物.

在各种磷酸化组氨酸类似物不断设计合成的同时, 对于含有翻译后修饰蛋白质的化学全合成^[48-53]与半合成^[54-58]技术也在不断发展. 人们也开始研究如何制备含有这些类似物的多肽或者蛋白质. Webb 小组^[59]首先将化合物 8 应用在 Fmoc- 固相合成中, 通过脱保护得到自由的磷酸基团. 此外, 他们还通过理论计算证明该类似物与磷酸化组氨酸的相似性. 后来, 该小组^[60]又进一步对磷酸基团的保护基进行了探索与筛选, 并优化了此磷酸化组氨酸类似物在 Fmoc- 固相合成中的应用条件. Piggott 小组^[61]也对氨基、羧基和磷酸基团的保护基进行了系统性的合成与比较, 并将这些类似物的实用性进行了探索. 发展磷酸化蛋白质的化学全合成是本领域重要研究方向之一.

4.3 抗体研究

抗体在磷酸化蛋白质的生化研究中是一个必要的研究工具, 而且已经发挥了重要的作用^[62]. 因此, 人们也考虑到寻找磷酸化组氨酸的抗体, 但均未成功. 究其原因可能是由于磷酸化组氨酸的不稳定性导致其在血浆里迅速发生水解而无法引发足够强度的免疫应答. 此后, 人们尝试利用无法水解的类似物来诱导抗体的探索, 例如含吡咯的类似物, 但得到的抗体并不能正确识别原始的磷酸化组氨酸结构^[43]. Marletta 及其合作者^[63]用 ATP γ S 作为组氨酸磷酸化激酶的底物, 并进一步用 PNBm 处理磷酸化产物形成了半合成的磷酸化组氨酸表位, 获得了阶段性的成功. 但是得到的抗体也存在一定缺陷, 即不能区别不同的磷酸化氨基酸(图 4).

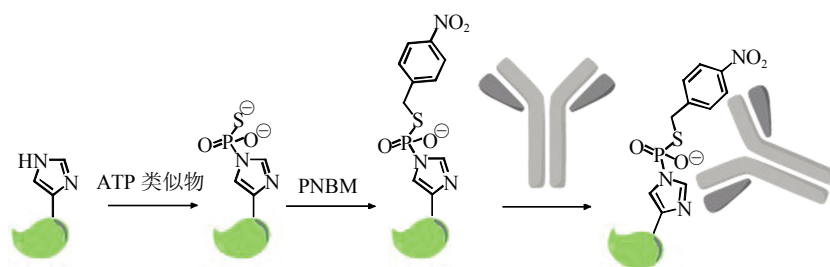


Fig. 4 Scheme for the phosphohistidine analog induced antibody generation process using ATP γ S

图 4 ATP γ S 作为磷酸化组氨酸类似物诱导抗体产生的示意图

值得注意的是,有些针对其他磷酸化氨基酸的抗体由于特异性不强也可以识别磷酸化组氨酸。Frackelton 研究组^[64]发现,抗磷酸化酪氨酸的抗体 MA-2G8 具有交叉作用,该抗体不能区分磷酸化组氨酸与磷酸化酪氨酸。直到 2010 年, Muir 小组^[44]在研究磷酸化组氨酸类似物的同时研制出了磷酸化组氨酸的抗体蛋白。他们用组蛋白 H4 的 18 位组氨酸磷酸化诱导产生了特异性抗体,这一策略对其他磷酸化蛋白质抗体的研制可能同样适用。此后, Muir 等^[65]又得到了第一个不具有序列依赖性的磷酸化组氨酸特异性抗体(pan-pHis 抗体)。他们利用 τ -磷酸组氨酸的水解稳定类似物(pTze)作为半抗原诱导产生抗体。该抗体已经被成功应用于 ELISA、Western 免疫印迹、斑点杂交(Dot blot)测试和免疫沉淀等各类生化实验。他们进一步在细胞裂解液中借助 MS 检测鉴定出了一系列含有磷酸化组氨酸的蛋白质,并得到一系列相关生物学发现。

5 主要生理功能

由于含磷酸化组氨酸的蛋白质在生物体中起到了重要的调节作用,人们对其生物学功能做了系统性的研究。目前发现的与组氨酸磷酸化相关的蛋白主要包括 4 类^[66]。a. 磷酸化组氨酸作为酶的中间产物参与到磷酸基团向小分子的转运过程,包括核苷二磷酸激酶(NDPK)、ATP-柠檬酸裂解酶等。b. 能够被组氨酸磷酸激酶磷酸化的蛋白质,例如膜联蛋白 I、ATP-柠檬酸水解酶、异质化的三聚化 G 蛋白等。c. 具有组氨酸激酶活性的蛋白质,包括二组分信号通路中的组氨酸激酶、NDPK 与组蛋白 H4 组氨酸激酶等。d. 磷酸酶,包括磷酸化组氨酸磷酸酶以及各种蛋白磷酸酶。

组氨酸磷酸化参与到细菌、真菌、植物中的两组分和多组分磷酸转移信号通路。原核生物中比较

典型的磷酸化组氨酸系统包括糖磷酸转移酶系统、细菌二组分系统以及一些其他受酶催化的过程,例如二磷酸核苷激酶和辅酶 A 合成酶等^[21]。而在高等真核动物信号传导过程中,磷酸化组氨酸对胰岛素分泌过程起到的重要调控作用,下面将重点介绍。

5.1 磷酸化组氨酸在原核生物中的生理作用

5.1.1 磷酸化丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)。

原核生物中很多体系都涉及到磷酸化组氨酸,包括新陈代谢、物质转运等^[67]。其中磷酸化丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)介导了糖类以磷酸化的形式穿过细胞膜的过程,而且已经有较为详细的研究^[21]。糖的磷酸化包含四个连续的磷酸基团转移步骤,而糖穿过细菌细胞膜的转运过程也与此过程同步发生。此过程主要涉及酶 I 和酶 II 两类磷酸化酶。在这一过程中,酶 I (EI)以磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)为底物首先主动磷酸化,然后将磷酸基团转移到含组氨酸的蛋白(HPr)上。酶 II 是一类含有多个结构域的酶类或者独立的蛋白质,分为 E II A 和 E II B 等多类。其中, E II A 催化该含组氨酸蛋白上的磷酸基团转移到 E II B。糖类分子被糖特异性-E II B 催化磷酸化,并由膜结合的 E II C 介导穿过细胞膜(图 5)。值得注意的是,除了 E II B 类酶是半胱氨酸侧链巯基磷酸化外,PTS 中其他酶类都是组氨酸残基磷酸化。NMR 研究进一步表明, π -磷酸组氨酸与 τ -磷酸组氨酸都存在于本过程中: E1 与 E II A 酶所含的组氨酸为 τ -磷酸化,而 HPr 所含的组氨酸为 π -磷酸化。这也意味着磷酸基团在两种组分间的相互转化。然而,PTS 相关蛋白质磷酸化形式的蛋白质晶体结构还没有报道过^[68]。此外, Suh 小组^[69]用电脉冲法研究了 E I 与 HPr 两个磷酸酶之间的磷酸基团转移过程,并在毫秒尺度上揭示了磷酸化反应的动力学特性。

不仅原核细胞内有磷酸化调控体系,人溶质转

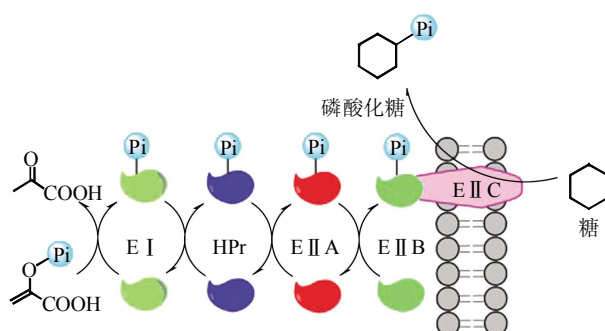


Fig. 5 Scheme for phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system

图 5 磷酸化丙酮酸-糖磷酸转移酶系统示意图

运蛋白 SLC37 家族在糖转运过程中也有类似的磷酸化调控机制^[70]. 该糖-磷酸基团交换体系含有 A1~A4 四种固定于内质网膜的蛋白质. 这些蛋白质通过多步磷酸化过程, 最终实现将葡萄糖以葡萄糖-6-磷酸的形式转运出膜.

5.1.2 二组分系统.

磷酸化组氨酸在二组分系统中也发挥重要调节作用, 而这样的二组分系统本身广泛存在于真细菌、古细菌和真核生物中. 这些二组分信号传递系统与细胞外 pH、温度、趋化因子、渗透压的变化等刺激因素相耦合, 触发细胞功能、生长、分化和运动状态的变化, 从而起到感受器的作用^[68].

二组分系统中较为保守的组成成分包括组氨酸激酶和一个起到响应作用的调控蛋白. 以细菌趋化性感系统为例, 组氨酸激酶 CheA 折叠形成三个结构域, 即刺激感受域、二聚化功能域与激酶功能域. 刺激感受域含有两个跨膜组分, 用以感受外界刺激; 二聚化功能域的功能是形成同源二聚体; 激酶功能域可以以 ATP 为底物催化该同源二聚体中两个单体间发生相互磷酸化. 因此, 二聚化功能域是激酶实现功能所必需的. 值得注意的是, 该过程涉及到的是组氨酸的 τ -磷酸化^[71]. 起响应作用的调控蛋白作为二元体系的另一组分, 含有调节域 (regulator) 与效应域 (effector) 两部分. 磷酸基团将从二聚化功能域的组氨酸残基上转移到调控蛋白的调节域天冬氨酸残基上, 通过蛋白质-蛋白质相互作用使效应域发生构象变化, 并激活效应域传递信号到下游 (图 6)^[72]. 这类系统的存在使得生物体能够敏锐地感知外界环境变化.

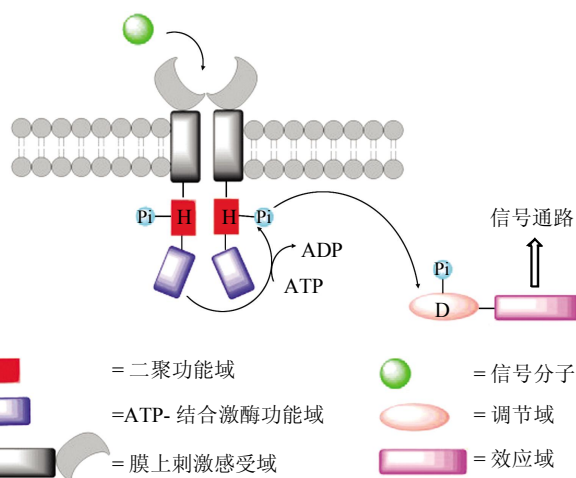


Fig. 6 Scheme for bi-component system signaling pathway in bacteria

图 6 细菌二组分系统信号传导示意图

5.2 磷酸化组氨酸在哺乳动物中的生理作用

磷酸化组氨酸在哺乳动物细胞中也发挥了多种作用. 人们在哺乳动物细胞中发现了若干组氨酸激酶, 其中典型的包括二磷酸腺苷酸激酶 (NDPK)、琥珀酰辅酶 A 合成酶 (SCS)、组蛋白 H4 组氨酸激酶和人类线粒体二组分组氨酸激酶类等. 同时, 仍有报道新的磷酸化组氨酸相关蛋白, 例如 Zhu 等^[73]于 2012 年报道了首个脊椎动物的组氨酸去磷酸化酶 PHP14. 该 14 ku 的蛋白在肝癌、肺癌细胞的增殖中有重要作用. 组蛋白上组氨酸去磷酸化酶也对于肝脏的再生与癌变密切相关^[74]. 磷酸化组氨酸在胰岛细胞中的信号传递相关的作用已经研究得较为清楚. 已有报道的相关调控作用包括参与 GTP 代谢、参与胰岛细胞内生性的 G 蛋白调控 (且该 G 蛋白参与葡萄糖诱导胰岛素分泌过程 (GSIS))、调节线粒体代谢酶系、调节如类异戊二烯在内的其他细胞内代谢过程^[68]等.

5.2.1 独立于线粒体氧化呼吸的 GTP 合成.

许多工作表明 GTP 在小鼠及人胰岛素的生理性分泌过程中起到重要作用^[75]. Pintar 小组^[76]在小鼠胰岛细胞中进行相关研究, 首次证明了 GTP 对于胰岛素的分泌是必要的, 而且还可能是该过程的限速步骤. 但是胰岛细胞中二磷酸核糖核苷酸 (NDP) 向三磷酸核糖核苷酸 (NTP) 的转化机制尚不清楚, 而后者才是该过程中起直接作用的嘌呤核苷酸的存在形式. 尽管电子转移链理论上可以以 GDP 作为受体来实现底物水平磷酸化, 但 GDP 并

不是线粒体核酸转移酶的受体, 因而 GTP 的形成过程无法与线粒体中的氧化磷酸化过程相耦联. 另一方面, Srere 等^[77]报道, NDPK 可能具有将线粒体中的反应与胞内反应相耦联的作用, 而这些胞内反应大多是胰岛素分泌所必需的. 后续研究表明, NDPK 可能对维持 GTP/GDP 的比例起到关键调节作用, 从而进一步调节 G 蛋白功能^[78]. 这一过程的具体步骤可能是 NDPK 将线粒体产生的 ATP 的末端磷酸基团直接转移到胞内的 GDP 上, 因而对 GTP/GDP 比例变化起到了“缓冲”作用. 这种高比例的 GTP/GDP 对于维持胰岛素分泌可能比 GTP 的绝对量更为重要^[79].

5.2.2 调节胰岛细胞内部 G 蛋白.

在调控 GTP 水平的基础上, 磷酸化组氨酸进而能够起到对胰岛细胞中 G 蛋白的调节作用^[80]. 此作用范围较为广泛, 包括三聚化的大 G 蛋白和单体小 G 蛋白. 通过对 G 蛋白的调节, 磷酸化组氨酸相关蛋白可以进而实现对胰岛素分泌的调节^[81].

a. 对小 G 蛋白功能的调节.

众多研究表明, nm23-H 家族基因所表达的 NDPK/NM23 家族蛋白对小 G 蛋白及其相关信号通路有重要调控作用, 而 NDPK 本身即受到组氨酸磷酸化的调控. Gallagher 及其合作者^[82]以 NIH-3T3 细胞株为研究对象, 发现其中 NDPK 对 Rac 蛋白相关的皮层活动过程以及 GTP 依赖的胞内囊泡运输过程都起到调节作用. 该研究还表明, 这些效应并不是由囊泡定位的 NDP 激酶的作用所导致的. 研究显示, 在 GTP 酶突变的条件下, 高浓度的 GTP 会使这些小 G 蛋白保持与 GTP 的结合作用而持续激活. Fischbach 等^[83]则报道了 NDPK 使得原癌基因 Ras 蛋白失活的作用. 这意味着 NDPK 具有类似 GTP 酶的性质. 另一方面, NM23 家族蛋白激酶对细胞的调控作用早在 1999 年就为 Kahn 小组^[84]所报道. 该小组^[85]首先报道了一个 35 ku 的蛋白质并命名为 Rad(Ras 相关糖尿病蛋白). 接下来, 他们系统性地研究了 NM23 蛋白与 Rad 的作用. 研究发现, NM23 既能促进 Rad 与 GTP 结合, 也能促进 Rad-GTP 向 Rad-GDP 的转化. 他们揭示了这种双向双分子调节机制. 由于 Rad 对葡萄糖摄取具有调控作用^[86], NM23 也因此与某些种类的糖尿病相关. 综合以上结果, nm23/NDPK 的信号传递作用对调节小 G 蛋白起着重要的作用.

b. 对三聚化 G 蛋白功能的调控.

除了对单聚的小 G 蛋白的作用外, 磷酸化组

氨酸对三聚体的 G 蛋白也有间接的调节作用. Piacentini 等^[87]早在 1996 年就报道了磷酸基团的转移在大 G 蛋白激活过程中起到的作用; 后来, Hippe 等^[88]提出了假想的 NDPK B 与 $G\alpha$ 亚基的复合物 3D 结构. 同时, 他们提出了 NDPK/NM23 类酶对三聚化 G 蛋白的激活存在的两种可能机制. 第一种, NDPK 利用 ATP 将 G 蛋白附近的 GDP 三磷酸化得到 GTP, GTP 转移到 $G\alpha$ 亚基上完成 GTP/GDP 转换. 第二种机制则明显不同, 在胞内 ATP 存在下, NDPK/NM23 将 G 蛋白亚基上的 GDP 转磷酸化形成 GTP. 相比而言, 第一种理论得到的认可度较高. 此外, Wieland 等^[89]的早期研究表明, HL-60 细胞中 G 蛋白的 β 亚基存在一个依赖 GTP 的磷酸化过程, 后续研究证明对 G 蛋白功能起关键作用的正是这一 G 蛋白 β 亚基的组氨酸磷酸化. 在此基础上, Klinker 等^[90]对 NDPK 在对视网膜 G 蛋白这一转导蛋白的激活过程所发挥的作用进行了进一步研究, 而这一过程也就是通过组氨酸磷酸化实现的. 他们在可溶的转导蛋白提取液中检测到明显的 NDPK 活性, 这一活性物质被认为是转导蛋白-NDPK 复合物. 这一转导蛋白-NDPK 复合物表现出对 GDP 作为磷酸基团受体的偏好性. 基于以上现象, 他们认为水溶液制备的转导蛋白中含有对于 GDP 敏感的 NDPK. 同时, 转导蛋白的 β 亚基在促进三聚化 G 蛋白的激活过程中起到了作为磷酸化的 NDPK 中间体的作用. Cuello 等^[91]报道了一个最为直接的证据: 三聚化 G 蛋白的激活是通过一个高能磷酸基团从 NDPK 的磷酸化组氨酸转移到三聚化 G 蛋白 β 亚基而实现的. Hippe 等^[92]在 H10 细胞中也有类似发现, 他们的研究证明了 NDPK 与 G 蛋白 $\beta\gamma$ 复合物之间的相互联系. 综合这些研究结果可知, NDPK 对三聚化 G 蛋白的确存在激活作用. 基于这些发现, 研究者们^[88]还最终提出了依赖受体的三聚化 G 蛋白激活机制.

5.2.3 其他调节机制.

除了以上几种重要的调节机制外, 磷酸化组氨酸对真核生物其他的一些代谢过程也有重要调节作用.

a. 磷酸化组氨酸对线粒体一些中间代谢过程酶系的激活起到调控作用, 包括 ATP-柠檬酸水解酶(ACL)、琥珀酰辅酶 A 合成酶(SCS)等. ACL 承担着为神经组织合成乙酰胆碱提供乙酰 CoA 的任务. Fan 小组^[93]利用多种生化手段详细地研究了人

ACL 的活性位点(例如 760 位组蛋白)、催化机制及动力学特点. ACL 是人蛋白质组氨酸去磷酸化酶(PHP)的一个已知底物, 故而 PHP 对神经系统的调节一直被广泛关注^[94]. 同时, PHP 可以被血管壁等组织细胞所表达产生, Krieglstein 及其合作者^[95]研究了 PHP 的过表达或下调对血管内皮细胞的存活情况的影响. 此外, SCS 也是该领域的研究重点之一. 包括 Steeg 等^[96]与 Shulman 等^[97]的一系列重要研究证明, SCS 和线粒体 NDPK(mNDPK)^[98]与胰岛素分泌细胞存在潜在联系. 这些研究都显示了线粒体中磷酸化组氨酸对胰岛素分泌过程可能起到的重要调控作用. 最近研究表明, 心脏细胞线粒体中也同样存在基质和氧化呼吸蛋白复合体的磷酸化调控^[99].

b. 磷酸化组氨酸对离子通道也有相应的调控作用. Srivastava 等^[100]于 2006 年首先报道 NDPK 对钙离子激活的钾离子通道 KCa3.1 的调控作用. 他们发现 KCa3.1 与 NDPK-B 结合后能使其本身的组氨酸残基磷酸化, 进而激活该钾离子通道. 这一作用在多种细胞中都能调控钙离子内流. 该研究同时发现了 T 细胞活化所必需的一个新的通路, 对本领域发展有奠基性作用.

c. 磷酸化组氨酸对类异戊二烯代谢的调控作用. 研究表明大部分小 G 蛋白和三聚化 G 蛋白的亚基都会在其 C 端半胱氨酸侧链上进行翻译后修饰, 这一修饰基团对于其与对应的效应蛋白或者磷脂膜对应位点的相互作用是必需的^[101]. 研究人员利用基因手段或者位点特异性的蛋白法尼基化(Farnesylation)和香叶基化(Geranylation)抑制剂, 证明类异戊二烯衍生的蛋白质修饰模式对 GSIS 是至关重要的. 这些发现也在 INS 832/13 细胞中通过分子生物学及生物化学手段得以证实^[102].

6 结论与展望

在经历了一系列的探索后, 人们对磷酸化这一蛋白质调控机制有了更加深入的认识. 磷酸化组氨酸是三种含有 N—P 共价键的磷酸化氨基酸之一. 作为一种较为特殊的磷酸化形式, 它对于人们认识蛋白质的磷酸化调节机制有促进作用. 由于该磷酸化形式不同于其他磷酸化氨基酸的化学性质, 人们需要针对含有磷酸化组氨酸的蛋白质发展全新的制备、分离与表征策略^[103]. 本文综述了相关化学技术的发展和目前对于磷酸化组氨酸生物功能的研究情况.

目前, 由于磷酸化组氨酸具有化学不稳定性, 因而制备含有天然结构磷酸化组氨酸的蛋白质是当前一个重要的科学问题. 为了解决这一问题, 人们发展了各种类似物作为磷酸化组氨酸的替代品. 因此, 如何将磷酸化组氨酸及其类似物引入待研究的蛋白质中就成了当前工作的挑战. 目前, 可用来解决该难题的策略主要包括蛋白质化学合成及非天然氨基酸定点嵌入两种途径. 迄今为止, 人们利用 Fmoc- 固相合成法已得到了若干含有磷酸化组氨酸类似物的多肽, 而相应全长蛋白或完整结构域的全合成工作还未有报道, 这可能是今后研究的重点之一. 另外, 非天然氨基酸定点嵌入的策略也是获得含有非天然氨基酸蛋白质的重要技术^[104-105]. 该技术近期已有较为迅速的发展, 成功地将一系列非天然氨基酸定点引入了目标蛋白, 并进一步完成了对其功能的研究^[55, 106-111]. 因此, 能否利用此技术将磷酸化组氨酸类似物定点引入目标蛋白也将成为下一步研究的重点. 其次, 调控磷酸化组氨酸相关代谢通路的发现与机理研究也是磷酸化组氨酸生物学功能研究的重点之一. 将新发展的抗体作为分子生物学工具^[70]可能发现更多的新组分与新机制.

参 考 文 献

- [1] Levene P A, Alsberg C L. The cleavage products of vitellin. *J Biol Chem*, 1906, **2**(1): 127-133
- [2] Lipmann F A, Levene P A. Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid. *J Biol Chem*, 1932, **98**(1): 109-114
- [3] Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 2004, **116**(2): 191-203
- [4] Matthews H R. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins—a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & Therapeutics*, 1995, **67**(3): 323-350
- [5] 胡 筌, 郭燕婷, 李艳梅. 蛋白质翻译后修饰研究进展. *科学通报*, 2005, **50**(11): 1061-1072
Hu Q, Guo Y T, Li Y M. *Chinese Science Bulletin*, 2005, **50**(11): 1061-1072
- [6] Severin S E, Yudelovich R J. Synthesis and properties of phosphorylated b-alanine, l-histidine, and a-alanine. *Biokhimiya*, 1947, **12**(2): 105-110
- [7] Boyer P D. Phosphohistidine. *Science*, 1963, **141**(358): 1147-1153
- [8] Klumpp S, Krieglstein J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Euro J Biochem*, 2002, **269** (4): 1067-1071
- [9] Alex L A, Simon M I. Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends in Genetics*, 1994, **10**(4): 133-138

- [10] Ota I M, Varshavsky A. A yeast protein similar to bacterial 2-component regulators. *Science*, 1993, **262**(262): 566–569
- [11] Maeda T, Wurgler-Murphy S M, Saito H. A 2-component system that regulates an osmosensing map kinase cascade in yeast. *Nature*, 1994, **369**(6477): 242–245
- [12] Muimo R, Hornickova Z, Riemen C E, *et al.* Histidine phosphorylation of annexin I in airway epithelia. *J Biol Chem*, 2000, **275**(47): 36632–36636
- [13] Matsubara M, Mizuno T. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 2000, **470**(2): 118–124
- [14] Klumpp S, Krieglstein J. Reversible phosphorylation of histidine residues in vertebrate proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, **1754**(1–2): 291–295
- [15] Klumpp S, Hermesmeier J, Selke D, *et al.* Protein histidine phosphatase: A novel enzyme with potency for neuronal signaling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2002, **22** (12): 1420–1424
- [16] Gajewski S, Comeaux E Q, Jafari N, *et al.* Analysis of the active-site mechanism of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I : a member of the phospholipase D superfamily. *J Mol Biol*, 2012, **415**(4): 741–758
- [17] Tan E L, Besant P G, Zu X L, *et al.* Histone H4 histidine kinase displays the expression pattern of a liver oncodevelopmental marker. *Carcinogenesis*, 2004, **25**(11): 2083–2088
- [18] Besant P G, Tan E, Attwood P V. Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, **35**(3): 297–309
- [19] Attwood P V. P-N bond protein phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 2012, **1834** (1): 470–478
- [20] Hultquist D E, Moyer R W, Boyer P D. The preparation and characterization of 1-phosphohistidine and 3-phosphohistidine. *Biochemistry*, 1966, **5**(1): 322–331
- [21] Schenkels C, Erni B, Reymond J L. Phosphofurylalanine, a stable analog of phosphohistidine. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, **9**(10): 1443–1446
- [22] Puttick J, Baker E N, Delbaere L T. Histidine phosphorylation in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 2008, **1784**(1): 100–105
- [23] Horecker B, Jakoby W, Karlson P, *et al.* Nomenclature of phosphorus-containing compounds of biochemical importance-(recommendations 1976)-IUPAC-IUB -commission-on-biochemical-nomenclature. *Biochemistry Journal*, 1978, **171**(1): 1–19
- [24] Zu X L, Besant P G, Attwood P V. Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, Vol 52, Protein Mass Spectrometry, New York: Elsevier Pub. Co., 1959: 315–352
- [25] Duclos B, Marcandier S, Cozzone A J. Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 1991, **201**: 10–21
- [26] Hultquist D E. The preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1968, **153**(2): 329–340
- [27] Chen C C, Bruegger B B, Kern C W, *et al.* Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver. *Biochemistry*, 1977, **16**(22): 4852–4855
- [28] Medzihradszky K F, Philipps N J, Senderowicz L, *et al.* Synthesis and characterization of histidine-phosphorylated peptides. *Protein Science*, 1997, **6**(7): 1405–1411
- [29] Hohenester U, Ludwig K, König S. Chemical phosphorylation of histidine residues in proteins using potassium phosphoramidate-A tool for the analysis of acid-labile phosphorylation. *Current Drug Delivery*, 2012, **10**(1): 58–63
- [30] Ross A R. Identification of histidine phosphorylations in proteins using mass spectrometry and affinitybased techniques. *Methods in Enzymology*, 2007, **423**: 549–572
- [31] Besant P G, Attwood P V. Detection and analysis of protein histidine phosphorylation. *Mol Cell Biochem*, 2009, **329**(1–2): 93–106
- [32] Vogel H J. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of phosphoproteins. *Methods in Enzymology*, 1989, **177**: 263–282
- [33] Gassner M, Stehlik D, Schrecker O, *et al.* The phosphoenolpyruvatedependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. ¹H and ³¹P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *Euro J Biochem*, 1977, **75**(1): 287–296
- [34] Zhou H, Dahlquist F W. Phosphotransfer site of the chemotaxis-specific protein kinase CheA as revealed by NMR. *Biochemistry*, 1997, **36**(4): 699–710
- [35] Collins M O, Yu L, Choudhary J S. Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *Proteomics*, 2007, **7** (16): 2751–2768
- [36] Napper S, Kindrachuk J, Olson D J, *et al.* Selective extraction and characterization of a histidine-phosphorylated peptide using immobilized copper (II) ion affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**(7): 1741–1747
- [37] Wilke K E, Francis S, Carlson E E. Activity-based probe for histidine kinase signaling. *J Am Chem Soc*, 2012, **134** (22): 9150–9153
- [38] Arora D P, Boon E M. Unexpected biotinylation using ATP- γ -biotin-LC-PEO-amine as a kinase substrate. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, **432**(2): 287–290
- [39] Lasker M, Bui C D, Besant P G, *et al.* Protein histidine phosphorylation: increased stability of thiophosphohistidine. *Protein Science*, 1999, **8**(10): 2177–2185
- [40] Pirrung M C, James K D, Rana V S. Thiophosphorylation of histidine. *J Org Chem*, 2000, **65**(25): 8448–8453
- [41] Ruman T, Długopolska K, Jurkiewicz A, *et al.* Thiophosphorylation of free amino acids and enzyme protein by thiophosphoramidate ions. *Bioorganic Chemistry*, 2010, **38**(1–3): 74–80
- [42] Szewczuk L M, Tarrant M K, Cole P A. Protein phosphorylation by semisynthesis: from paper to practice. *Methods in Enzymology*, 2009, **462**: 1–24
- [43] Attwood P, Piggott M, Zu X, *et al.* Focus on phosphohistidine.

- Amino Acids, 2007, **32**(1): 145–156
- [44] Kee J M, Villani B, Carpenter L R, *et al.* Development of stable phosphohistidine analogues. *J Am Chem Soc*, 2010, **132** (41): 14327–14329
- [45] Pirrung M C, Drabik S J, Gothelf K V, *et al.* Preparation and incorporation into small peptides and combinatorial libraries of phosphohistidine analogs for study of prokaryotic two-component signal transduction systems. *Peptides for the New Millennium*, 2000, 16th American Peptide Symposium, 86–88
- [46] Eerland M F, Hedberg C. Design and synthesis of an Fmoc-SPPS-compatible amino acid building block mimicking the transition state of phosphohistidine phosphatase. *J Org Chem*, 2012, **77** (4): 2047–2052
- [47] Yang S H, Lee D J, Brimble M A. Synthesis of an NDPK phosphocarrier domain peptide containing a novel triazolyalanine analogue of phosphohistidine using click chemistry. *Org Lett*, 2011, **13**(20): 5604–5607
- [48] Fang G M, Li Y M, Shen F, *et al.* Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Edit*, 2011, **50**(33), 7645–7649
- [49] Huang Y C, Li Y M, Chen Y, *et al.* Synthesis of autophagosomal marker protein LC3- II under detergent-free conditions. *Angew Chem Int Edit*, 2013, **52**(18): 4858–4862
- [50] Avital-Shmilovici M, Mandal K, Gates Z P, *et al.* Fully convergent chemical synthesis of ester insulin: determination of the high resolution X-ray structure by racemic protein crystallography. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(8): 3173–3185
- [51] Fang G M, Wang J X, Liu L. Convergent chemical synthesis of proteins by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Edit*, 2012, **51**(41): 10347–10350
- [52] Mandal K, Uppalapati M, Ault-Riche D, *et al.* Chemical synthesis and X-ray structure of a heterochiral {D-protein antagonist plus vascular endothelial growth factor} protein complex by racemic crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(37): 14779–14784
- [53] Zheng J S, Chang H N, Wang F L, *et al.* Fmoc synthesis of peptide thioesters without post-chain-assembly manipulation. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(29): 11080–11083
- [54] Vila-Perello M, Liu Z, Shah N H, *et al.* Streamlined expressed protein ligation using split inteins. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(1): 286–292
- [55] Li Y M, Yang M Y, Huang Y C, *et al.* Ligation of expressed protein α -hydrazides *via* genetic incorporation of an α -hydroxy acid. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(6): 1015–1022
- [56] Singla N, Erdjument-Bromage H, Himanen J P, *et al.* A semisynthetic Eph receptor tyrosine kinase provides insight into ligand-induced kinase activation. *Chemistry & Biology*, 2011, **18**(3): 361–371
- [57] Flavell R R, Muir T W. Expressed protein ligation (EPL) in the study of signal transduction, ion conduction, and chromatin biology. *Acc Chem Res*, 2009, **42**(1): 107–116
- [58] Chatterjee C, Muir T W. Chemical approaches for studying histone modifications. *J Biol Chem*, 2010, **285**(15): 11045–11050
- [59] McAllister T E, Nix M G, Webb M E. Fmoc-chemistry of a stable phosphohistidine analogue. *Chem Comm*, 2011, **47**(4): 1297–1299
- [60] McAllister T E, Webb M E. Triazole phosphohistidine analogues compatible with the Fmoc-strategy. *Org Biomol Chem*, 2012, **10**(20): 4043–4049
- [61] Mukai S, Flematti G R, Byrne L T, *et al.* Stable triazolyphosphonate analogues of phosphohistidine. *Amino acids*, 2012, **43**(2): 857–874
- [62] Mandell J W. Phosphorylation state-specific antibodies applications in investigative and diagnostic pathology. *Amer J Pathol*, 2003, **163**(5): 1687–1698
- [63] Carlson H K, Plate L, Price M S, *et al.* Use of a semisynthetic epitope to probe histidine kinase activity and regulation. *Anal Biochem*, 2010, **397**(2): 139–143
- [64] Frackelton A, Ross A, Eisen H. Characterization and use of monoclonal-antibodies for isolation of phosphotyrosyl proteins from retrovirus-transformed cells and growth factor-stimulated cells. *Mol Cell Biol*, 1983, **3**(8): 1343–1352
- [65] Kee J M, Oslund R C, Perlman D H, *et al.* A pan-specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. *Nat Chem Biol*, doi:10.1038/nchembio.1259
- [66] Kee J M, Muir T W. Chasing phosphohistidine, an elusive sibling in the phosphoamino acid family. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(1): 44–51
- [67] Laslo T, von Zaluskowski P, Gabris C, *et al.* Arabitol metabolism of *Corynebacterium glutamicum* and its regulation by AtIR. *J Bacteriology*, 2012, **194**(5): 941–955
- [68] Kowluru A. Emerging roles for protein histidine phosphorylation in cellular signal transduction: lessons from the islet β -cell. *J Cell Mol Med*, 2008, **12**(5B): 1885–1908
- [69] Yu T K, Yun Y J, Lee K O, *et al.* Active site phosphoryl groups in the biphosphorylated phosphotransferase complex reveal dynamics in a millisecond time scale. *FEBS Letters*, 2012, **586**(10): 1439–1444
- [70] Chou J Y, Sik Jun H, Mansfield B C. The SLC37 family of phosphate-linked sugar phosphate antiporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, **34**(2–3): 601–611
- [71] Surette M G, Levit M, Liu Y, *et al.* Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 939–945
- [72] West A H, Stock A M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, **26**(6): 369–376
- [73] Han S X, Wang L J, Zhao J, *et al.* 14-kDa Phosphohistidine phosphatase plays an important role in hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncology Lett*, 2012, **4**(4): 658–664
- [74] Besant P, Attwood P. Histone H4 histidine phosphorylation: kinases, phosphatases, liver regeneration and cancer. *Biochemical Society Transactions*, 2012, **40**(1): 290–293
- [75] Straub S G, James R, Dunne M J, *et al.* Glucose augmentation of mastoparan-stimulated insulin secretion in rat and human pancreatic islets. *Diabetes*, 1998, **47**(7): 1053–1057

- [76] Metz S, Rabaglia M, Pinter T. Selective Inhibitors of GTP synthesis impede exocytotic insulin release from intact rat islets. *J Biol Chem*, 1992, **267**(18): 12517–12527
- [77] Srere P A. Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, **56**(1): 89–124
- [78] Heidbüchel H, Callewaert G, Vereecke J, *et al.* Acetylcholine-mediated K⁺ channel activity in guinea-pig atrial cells is supported by nucleoside diphosphate kinase. *Pflügers Archiv*, 1993, **422**(4): 316–324
- [79] Padma P, Hozumi A, Ogawa K, *et al.* Molecular cloning and characterization of a thioredoxin/nucleoside diphosphate kinase related dynein intermediate chain from the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Gene*, 2001, **275**(1): 177–183
- [80] Robertson R P, Seaquist E R, Walseth T F. G-proteins and modulation of insulin-secretion. *Diabetes*, 1991, **40**(1): 1–6
- [81] Regazzi R, Kikuchi A, Takai Y, *et al.* The small GTP-binding proteins in the cytosol of insulin-secreting cells are complexed to GDP dissociation inhibitor proteins. *J Biol Chem*, 1992, **267**(25): 17512–17519
- [82] Gallagher B C, Parrott K A, Szabo G, *et al.* Otero, Receptor activation regulates cortical, but not vesicular localization of NDP kinase. *J Cell Sci*, 2003, **116**(15): 3239–3250
- [83] Fischbach M A, Settleman J. Specific biochemical inactivation of oncogenic Ras proteins by nucleoside diphosphate kinase. *Cancer Research*, 2003, **63**(14): 4089–4094
- [84] Zhu J, Tseng Y H, Kantor J D, *et al.* Interaction of the Ras-related protein associated with diabetes rad and the putative tumor metastasis suppressor NM23 provides a novel mechanism of GTPase regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(26): 14911–14918
- [85] Reynet C, Kahn C R. Rad-a member of the Ras family overexpressed in muscle of type- II diabetic humans. *Science*, 1993, **262**(5138): 1441–1444
- [86] Moyers J S, Bilan P J, Reynet C, *et al.* Overexpression of rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**(38): 23111–23116
- [87] Piacentini L, Niroomand F. Phosphotransfer reactions as a means of G protein activation. *Mol Cell Biochem*, 1996, **157**(1–2): 59–63
- [88] Hippe H J, Wieland T. High energy phosphate transfer by NDPK B/G β - γ complexes-an alternative signaling pathway involved in the regulation of basal cAMP production. *J Bioener Biomem*, 2006, **38**(3–4): 197–203
- [89] Wieland T, Nurnberg B, Ulibarri I, *et al.* Guanine nucleotide specific phosphate transfer by guanine-binding regulatory protein beta-subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid. *J Biol Chem*, 1993, **268**(24): 18111–18118
- [90] Klinker J F, Seifert R. Nucleoside diphosphate kinase activity in soluble transducing preparations. Biochemical properties and possible role of transducing-beta as phosphorylated enzyme intermediate. *Euro J Biochem*, 1999, **261**(1): 72–80
- [91] Cuello F, Schulze R A, Heemeyer F, *et al.* Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer *via* nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and G beta subunits - Complex formation of NDPK B with G beta gamma dimers and phosphorylation of His-266 in G beta. *J Biol Chem*, 2003, **278**(9): 7220–7226
- [92] Hippe H J, Lutz S, Cuello F, *et al.* Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer *via* nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and G beta subunits-Specific activation of G(s) α by an NDPK B-G β γ complex in H10 cells. *J Biol Chem*, 2003, **278**(9): 7227–7233
- [93] Fan F, Williams H J, Boyer J G, *et al.* On the catalytic mechanism of human ATP citrate lyase. *Biochemistry*, 2012, **51**(25): 5198–5211
- [94] Eißing A, Fischer D, Rauch I, *et al.* Acetylcholine content and viability of cholinergic neurons are influenced by the activity of protein histidine phosphatase. *BMC Neuroscience*, 2012, **13**(1): 31–37
- [95] Seeger A, Rose K, Ma N T, *et al.* Influence of protein histidine phosphatase overexpression and down-regulation on human umbilical-vein endothelial cell viability. *Cell Biology Int*, 2012, **36**(3): 245–249
- [96] Hartsough M T, Morrison D K, Salerno M, *et al.* Nm23-H1 metastasis suppressor phosphorylation of kinase suppressor of Ras *via* a histidine protein kinase pathway. *Science signaling*, 2002, **277**(35): 32389–32399
- [97] Kibbey R G, Pongratz R L, Romanelli A J, *et al.* Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metabolism*, 2007, **5**(4): 253–264
- [98] Kowluru A, Tannous M, Chen H Q. Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic β cell: evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. *Arch Biochem Biophys*, 2002, **398**(2): 160–169
- [99] Covian R, Balaban R S. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2012, **303**(8): H940–H966
- [100] Srivastava S, Li Z, Ko K, *et al.* Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell*, 2006, **24**(5): 665–675
- [101] Kowluru A, Amin R. Inhibitors of posttranslational modifications of G-proteins as probes to study the pancreatic beta cell function: potential therapeutic implications. *Current Drug Targets, Immune, Endocrine and Metabolic Disorder*, 2002, **2**(2): 129–139
- [102] Veluthakal R, Kaur H, Goalstone M, *et al.* Dominant negative α -subunit of farnesyl- and geranyl- geranyltransferase inhibits glucose-stimulated, but not KCl-stimulated, insulin secretion in INS 832/13 cells. *Diabetes*, 2007, **56**(1): 204–210
- [103] Cieřła J, Frączyk T, Rode W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, **58**(2): 137–148
- [104] Davis L, Chin J W. Designer proteins: applications of genetic code

- expansion in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**(3): 168–182
- [105]Chin J W. Reprogramming the genetic code. *EMBO Journal*, 2011, **30**(12): 2312–2324
- [106]Zhang M, Lin S, Song X, *et al.* A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(10): 671–677
- [107]Takimoto J K, Dellas N, Noel J P, *et al.* Stereochemical basis for engineered pyrrolysyl-tRNA synthetase and the efficient *in vivo* incorporation of structurally divergent non-native amino acids. *ACS Chem Biol*, 2011, **6**(7): 733–743
- [108]Greiss S, Chin J W. Expanding the genetic code of an animal. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(36): 14196–14199
- [109]Lin S, Zhang Z, Xu H, *et al.* Site-specific incorporation of photo-cross-linker and bioorthogonal amino acids into enteric bacterial pathogens. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(50): 20581–20587
- [110]Li Y, Pan M, Li Y, *et al.* Thiol-yne radical reaction mediated site-specific protein labeling *via* genetic incorporation of an alkynyl-L-lysine analogue. *Org Biomol Chem*, 2013, **11**(16): 2624–2629
- [111]Li Y, Yang M, Huang Y, *et al.* Genetically encoded alkenyl-pyrrolysine analogues for thiol-ene reaction mediated site-specific protein labeling. *Chem Sci*, 2012, **3**(9): 2766–2770

The Progress in Phosphohistidine Research*

WANG Zhi-Peng²⁾, CHEN Chen-Chen¹⁾, WANG Tian³⁾, WANG Miao²⁾, LI Yi-Ming^{1,2)**}

¹⁾ School of Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

²⁾ Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

³⁾ School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Protein phosphorylation is a wide existing protein post-translational modification in living organisms. This covalently linking mode between a certain amino acid and a phosphate group plays a sophisticated role in the regulation of protein structures and functions. Nowadays, nine amino acid residues have been found to have the capacity of phosphorylation, including histidine *via* a phosphamide bond. Although histidine phosphorylation has a significant regulatory function in both prokaryotic and eukaryotic cells, there has been seldom unimpeachable solution for the biologic research for a long time. Because of the diverse chemical properties of phosphohistidine *per se* from other phosphorylated amino acids, such as isomerism, chemical lability etc, it hydrolyzes easily during traditional handling methods. Due to the current progress in biochemistry and molecular biology, investigators have established innovative preparation, isolation and characterization strategies for phosphohistidine *ad hoc*. Therefore, the field begins to rapidly develop. Based on their chemical structures, this article analyzes the main physical and chemical properties as well as their reactivity of two phosphohistidine isomers, followed by the novel chemical biology tools and the main biological progresses.

Key words phsphohistidine, protein post-translational modification, phosphorylation, protein kinase

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00247

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(21102083).

**Corresponding author.

Tel: 13705518072, E-mail: lym2007@mail.ustc.edu.cn

Received: June 6, 2013 Accepted: August 19, 2013