



针对泛素化与去泛素化酶的化学探针*

梁家伟¹⁾ 武世典¹⁾ 王 天^{1)**} 郑清芸^{1,2)**}⁽¹⁾ 清华大学化学系, 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084;⁽²⁾ 上海交通大学转化医学研究院, 转化医学国家重大基础设施 (上海), 上海 200240)

摘要 蛋白质泛素化对真核细胞内几乎所有生理过程都具备调控作用。新的泛素化与去泛素化酶的发现、功能机制研究及相关化学分子干预是该领域的重要科学命题。针对泛素化与去泛素化酶的化学探针开发促进了人们对于蛋白质泛素化的形成、募集、信号传导及脱除过程中所涉及生化事件的理解。本文总结了近年来针对泛素化与去泛素化酶化学探针的发展, 归纳了不同类型探针的化学结构及合成方法, 并讨论了它们的各类应用, 包括筛查泛素依赖的信号传导系统、监控泛素相关酶活性、辅助泛素相关的识别和催化过程的分子机制解析等。

关键词 翻译后修饰, 泛素, 泛素化学探针

中图分类号 Q51, Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0569

蛋白质泛素化是一种广泛存在于真核生物中的翻译后修饰, 介导将泛素 (ubiquitin, Ub) ——由 76 个氨基酸组成的蛋白质, 通过共价键的方式连接到蛋白质底物上。泛素化生成依赖一套级联酶促反应: 泛素活化酶 (E1) 活性半胱氨酸在 ATP 供能下与泛素 C 端羧基形成 E1-Ub 硫酯中间体; 泛素缀合酶 (E2) 识别 E1-Ub 并取代 E1 形成 E2-Ub 硫酯中间体; 泛素连接酶 (E3) 催化将泛素 C 端与底物赖氨酸侧链氨基缩合, 形成酰胺键 (最经典的连接方式, 也称“异肽键”)。去泛素化酶 (DUB) 则通过水解异肽键, 将泛素从底物上脱除^[1]。人类细胞一共编码了 2 种 E1 酶、40 余种 E2 酶、600 余种 E3 酶和百余种 DUB 酶, 以上 4 类酶相互协调, 构成了复杂的泛素酶学系统 (图 1)。

泛素含有 7 个赖氨酸 (Lys) 侧链氨基与 1 个 N 端氨基, 可以进一步形成泛素链, 包括同源多聚泛素化 (共 8 种链接类型)、异源混合或分叉等多种组成形式^[2-3]。泛素也可以被磷酸化、酰基化等^[4]。最近研究还发现泛素化修饰可以发生在丝氨酸^[5]、苏氨酸^[6]、半胱氨酸^[7] 和非蛋白底物如脂多糖上^[8]。这些复杂的泛素信号受到了泛素生成酶和去泛素化酶系统精密协调, 调控了蛋白质降

解、DNA 损伤修复、炎症反应等几乎所有生理过程^[9], 其功能失调将会导致多种重大疾病的发生, 如癌症与神经退行性疾病等^[10-15]。

发现并鉴定特定泛素化的功能、阐明泛素化发生及去除的酶促催化机理对于认知高等生命过程的多维度调控, 开发疾病靶向干预策略十分关键。但现有的遗传学技术难以获取结构精准的复杂泛素修饰蛋白、难以实现泛素的分型检测及动态追踪, 限制了对参与特定过程的泛素化酶系统与去泛素化酶的鉴定及功能研究; 并且大量泛素化酶和去泛素化酶构象柔性动态, 缺少有效的研究工具用于酶学机制解析。化学探针作为一类可用于探测活性酶的工具^[16-19], 近期被发展并愈来愈多的用于研究泛素化过程的微观机制^[20-22]。本文旨在总结针对泛素化与去泛素化酶的化学探针及其应用。

* 博士后创新人才支持计划 (BX2021143), 中国博士后科学基金 (2021M701868) 和清华大学水木学者 (2021SM067) 资助项目。

** 通讯联系人。

郑清芸 Tel: 18811368446, E-mail: qyz@mail.tsinghua.edu.cn

王天 Tel: 13021256470, E-mail: Tian.Wang@childrens.harvard.edu

收稿日期: 2022-12-18, 接受日期: 2023-02-23

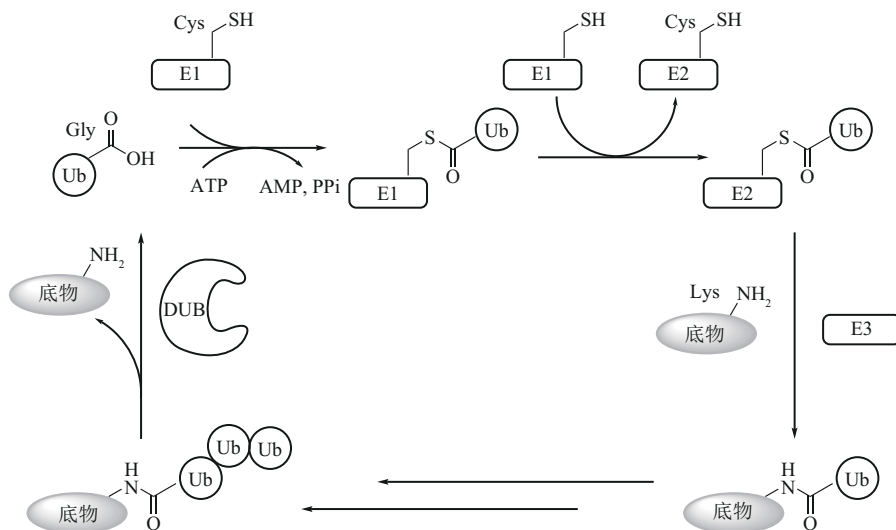


Fig. 1 Ub enzymatic system

图1 泛素酶学系统

泛素酶学系统主要由泛素活化酶E1、泛素缀合酶E2、泛素连接酶E3与去泛素化酶DUB构成。

1 泛素化学探针的设计与合成

1.1 泛素化学探针的定义

化学探针一般包含3个部分, 识别元件、反应基团和报告基团^[23] (图2)。识别元件提供了探针与研究目标相互作用的特异性。当探针与目标蛋白接近后, 反应基团便可以共价连接目标蛋白, 起到“捕获”的作用。报告基团(如荧光基团、生物素(biotin)等)起到捕获目标蛋白后的监控、检测或分离纯化的功能。



Fig. 2 The component of Ub-based chemical probes

图2 泛素化学探针的组成

泛素化学探针一般包括识别元件、反应基团和报告基团。

1.2 泛素化学探针的设计原理

泛素化学探针依据反应基团类型主要分为: 基于活性的共价反应探针(activity-based probes, ABP)和光交联探针。ABP可直接与活性位点(泛素酶系统中主要是半胱氨酸)反应形成共价键(图3)。如氯代物、溴代探针通过亲核取代反应与Cys结合^[24-25], Ub-醛基(Ub-al)、Ub-炔基(Ub-Prg)探针则可与Cys发生1,2-加成反应^[16, 26-27]。 α,β -不饱和羰基、 α,β -不饱和磺酰基等麦氏受体基团与

Cys发生1,4-加成反应^[17, 24]。

光交联探针包含光激发的高反应性基团(图3)。当探针与泛素酶通过非共价相互作用靠近时, 外加光照使探针产生高反应性的自由基或卡宾等中间体^[28-31], 此类中间体可通过对邻近C—H键的插入实现探针与目标蛋白间的共价连接。常用的活性基团有芳基叠氮化合物、二氮丙啶及二苯甲酮等^[32]。

1.3 泛素化学探针的合成方法

1.3.1 识别元件中泛素模块的合成

泛素模块可以通过化学全合成来获得(图4)。将泛素从46位丙氨酸(Ala)拆分, 利用固相多肽合成法制备Ub(1-45)和46位Ala替换成Cys的Ub(A46C-G76)两个片段, 再通过自然化学连接反应拼接, 随后通过脱硫将连接位点还原为Ala^[33]。也可在通过合成体系中添加伪脯氨酸(pseudoproline)和二甲氧基苄基二肽(dimethoxybenzyl dipeptide)等聚集破坏试剂(aggregation breakers)一次性固相合成全长泛素^[34-36]。

化学半合成法制备泛素模块的关键是获取便于后续模块接入的泛素硫酯或泛素酰肼。如内含肽(intein)剪接法, 大肠杆菌中表达Ub-intein融合蛋白可通过分子内氨基到巯基的酰基转移生成硫酯中间体, 随后在外源硫醇的作用下生成Ub-硫酯^[37-38]; Adams等^[39]发现将泛素C端突变为Cys Ub(G76C)

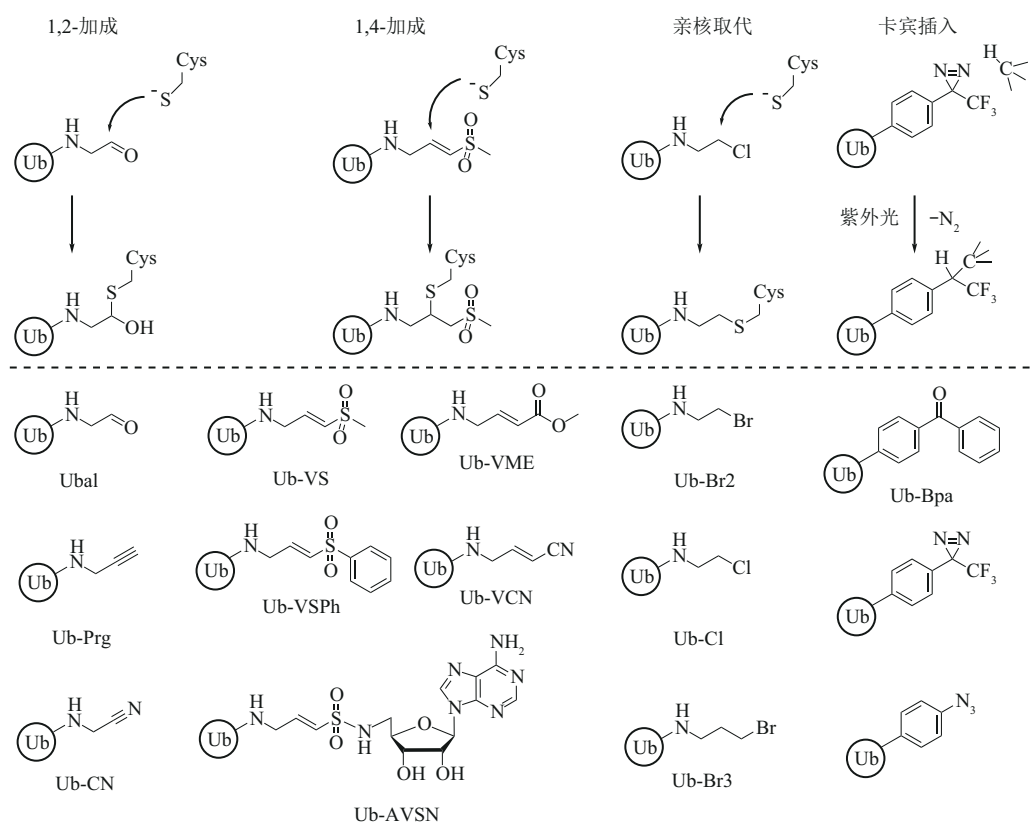


Fig. 3 The mechanism of Ub-based chemical probes

图3 泛素化学探针的原理

泛素化学探针一般可通过1,2-加成、1,4-加成、亲核取代、卡宾插入反应捕获目标蛋白。

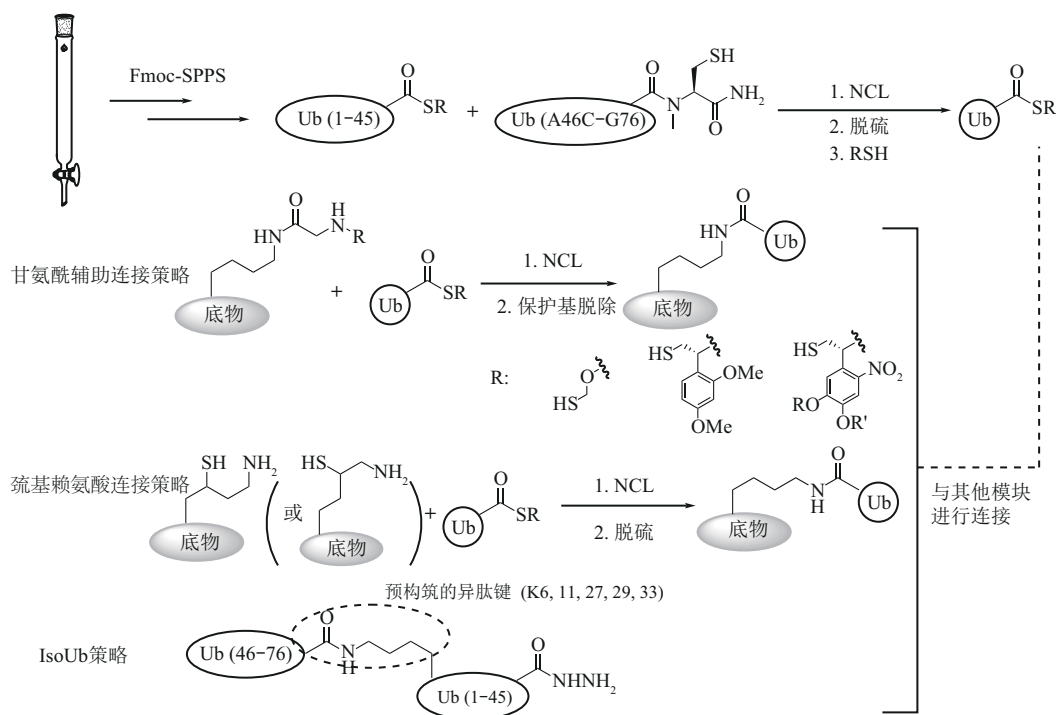


Fig. 4 Total chemical synthesis and conjugation strategy of Ub module

图4 通过纯化学策略合成和连接泛素模块

纯化学策略通过多肽固相合成方法获得泛素模块，通过3种可能的策略与其他模块连接。NCL，自然化学连接（native chemical ligation）；RSH，某种硫醇的缩写。

后, 也可经历分子内氨基到巯基的酰基转移过程生成硫酯结构, 之后利用脲解反应可制备 Ub(1-75) 酰肼; 除此以外, 泛素模块也可通过酶法合成获得。利用泛素水解酶 YUH1 水解泛素缀合物会生成硫酯中间体, 因此将 Asp 添加至泛素 C 端后向 Ub(1-77D) 中加入脲与 YUH1 可获得 Ub(1-76) 酰肼^[40]。利用 E1 活化泛素生成的 E1-Ub 活性中间体, 外源加入大量硫醇也可以高效制备泛素硫酯^[41-52]。

1.3.2 泛素模块与识别元件中其他模块的连接

基于化学合成的泛素硫酯结构, 目前共有 3 种辅助连接策略 (图 4)。a. 使用 N 端带有巯基修饰的甘氨酸结构作为辅基, 此类辅基与 Lys 侧链缩合后可与泛素硫酯通过 NCL 反应进行连接, 且在连接完成后可脱除^[53]。如 1-(2-硝基-4,5-烷氧基苯基)-2-巯基乙基、1-(2,4-二甲氧基苯基)-2-巯基乙基、2-氨基氧乙硫醇等结构^[54]。Ai 等^[55-56] 通过该策略合成了 C 端具有明确修饰结构的全长 β_2 肾上腺素受体^[57] 及 H2B K34Ub 等。b. 将 γ 或 δ -巯基赖氨酸引入底物蛋白中以替代待修饰 Lys, 发生自然化学连

接 (native chemical ligation, NCL) 反应后通过脱硫恢复 Lys 侧链^[58-59]。相较于甘氨酸辅助连接策略, 巯基赖氨酸连接策略速度更快。c. Liu 等^[60] 近期发展了利用结构为 Ub(46-76)~Ub(1-45) 的异泛素 (isoUb) 单元用于多泛素链的合成。采用不同连接方式 (K6、11、27、29、33) 的异肽键被预先构筑, 而 N 端的 Cys 结构与 C 端的酰肼结构可用于 isoUb 单元的聚合。借助该策略, K11/K48 分叉六泛素 (456 个氨基酸) 已被成功获取。

利用非天然氨基酸嵌入法可将类半胱氨酸辅助引入到底物蛋白中以辅助和泛素硫酯连接 (图 5)。Virdee 等^[61] 成功将一种被光敏基团保护的 γ 巯基赖氨酸引入到重组蛋白中, 光照脱除保护基后, 该重组蛋白可通过 NCL 反应与泛素硫酯进行连接, 并在脱硫恢复天然 Lys 侧链。此外, 可将叔丁氧羰基 (t-butyloxy carbonyl, Boc) 保护的 Lys 直接引入到底物蛋白中后, 并使用烯丙氧羰基 (Alloc) 对底物中其他氨基进行掩蔽, 随后脱除待修饰 Lys 上的 Boc 保护基并连接泛素硫酯, 最后再将剩余的 Alloc 保护基脱除以得到最终产物^[62]。

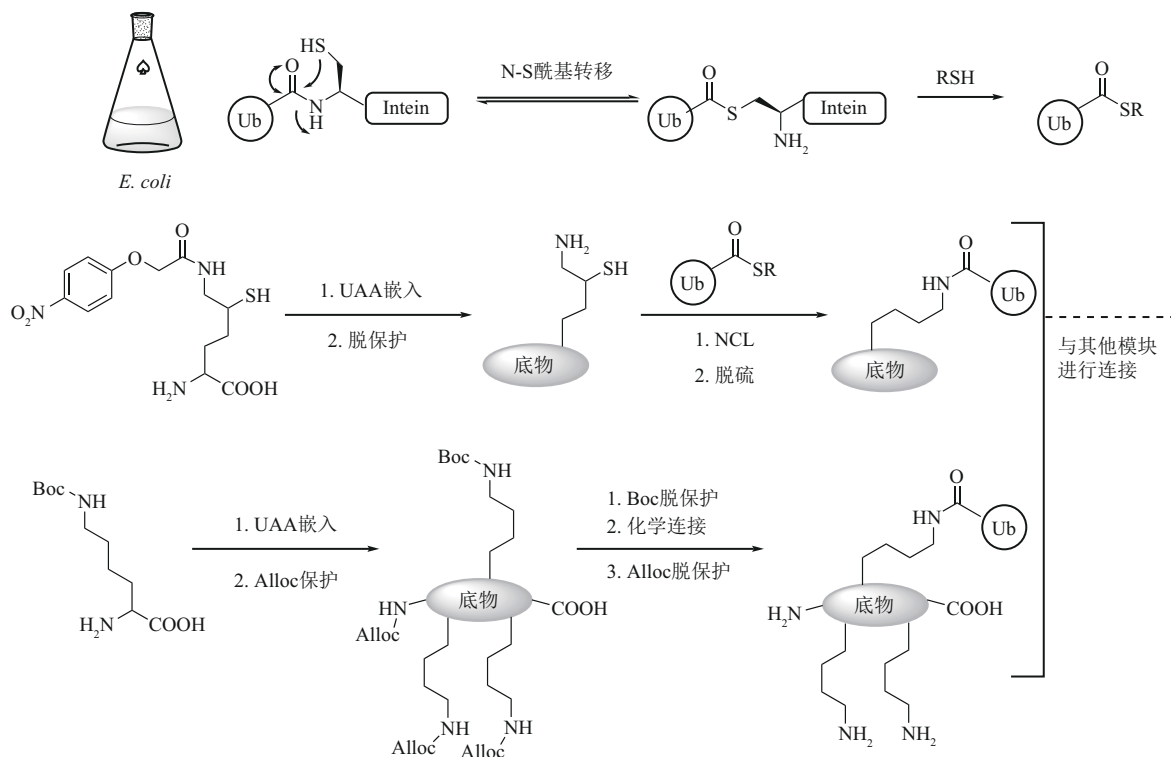


Fig. 5 Semi-synthesis and conjugation strategy of Ub module

图5 通过半合成策略获得和连接泛素模块

半合成策略主要通过内含肽剪接法获得泛素模块, 通过2种可能的策略与其他模块连接。

此外, 构筑非天然异肽键兼具模拟真实结构和获取方便的特点, 能够在体外大量制备, 因而被研究者们广泛采用^[63-68], 发展了以下策略: a. 二硫键活化连接策略^[69-70] (图6a); b. 基于1,3-二氯(溴)丙酮交联剂用于连接^[71-72] (图6b); c. 基于双功能分子如乙酰氨基甲基保护的2-((2-氯乙基)氨基)乙烷-1-硫醇(CAET)或乙酰氨基甲基保护的2-((2-氯乙基)氨基)苯乙烷-1-硫醇的半合成方案, 此类双

功能分子在与泛素化位点 Lys 突变为 Cys 的底物反应后, 进一步基于硫 NCL 连接泛素硫酯^[40-41, 73] (图6c, d); d. 点击化学连接策略^[74-75] (图6e); e. 巯基-烯基加成连接策略^[76] (图6f); f. 马来酰胺基团也可用于连接泛素模块与底物^[77] (图6g); g. Brik 等^[78] 通过化学合成法获得了C端带有氧亚胺基团的泛素模块, 其可以与带有乙醛基修饰的底物蛋白连接 (图6h)。

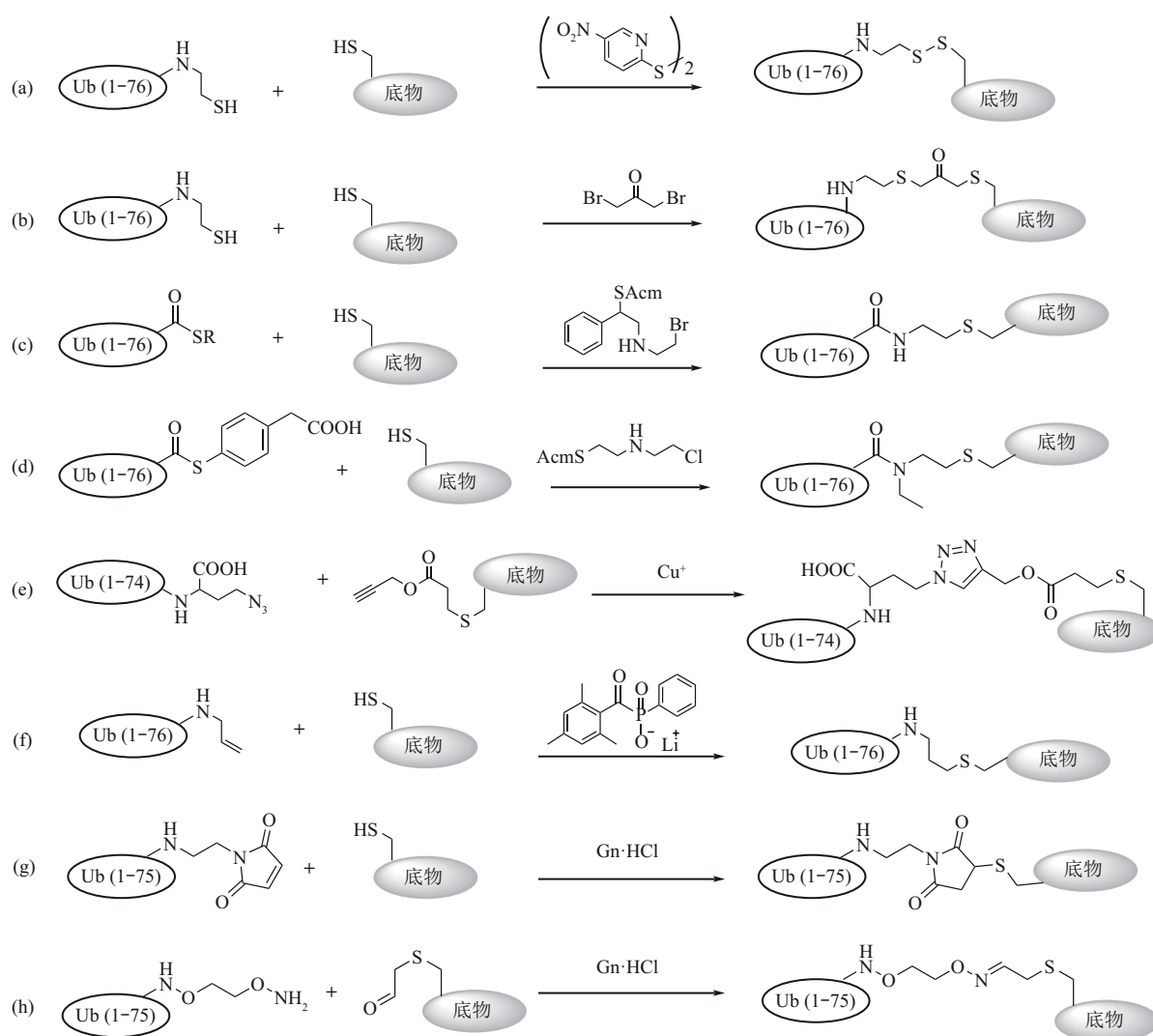


Fig. 6 Biorthogonal conjugation strategy of Ub module

图6 泛素模块的生物正交连接策略

泛素模块可以通过生物正交化学的方法与其他模块进行连接。

1.3.3 反应基团的引入

麦氏受体、卤原子等多数用于捕获催化半胱氨酸的反应基团可通过泛素硫酯的直接氨解引入^[24, 79] (图7a, b)。最近, 一种基于手足口病病毒蛋白酶的半合成手段也被用来获取不同类型的泛

素化学探针^[80] (图7c)。部分特殊反应基团的引入则需借助其他反应, 例如在 Ub-Dha 探针的制备过程中, 泛素的 Gly76 首先被突变为 Cys。随后, 2,5-二溴己二酰胺被用于消除巯基并产生具有反应活性的 α, β -不饱和羧酸结构^[19] (图7d)。

光交联基团亦有多种引入方法。含二氮丙啶的亮氨酸可经 SPPS 直接掺入泛素^[81] (图 7e), 含二苯甲酮基团的对苯甲酰-L-苯丙氨酸 (Bpa) 则可通过遗传密码子嵌入被添加至泛素中 (图 7f)^[28]。此

外, 将泛素特定位点的氨基酸突变为 Cys 并使之与含有二氮丙啶的溴代小分子反应也可在泛素上引入二氮丙啶基团^[82]。

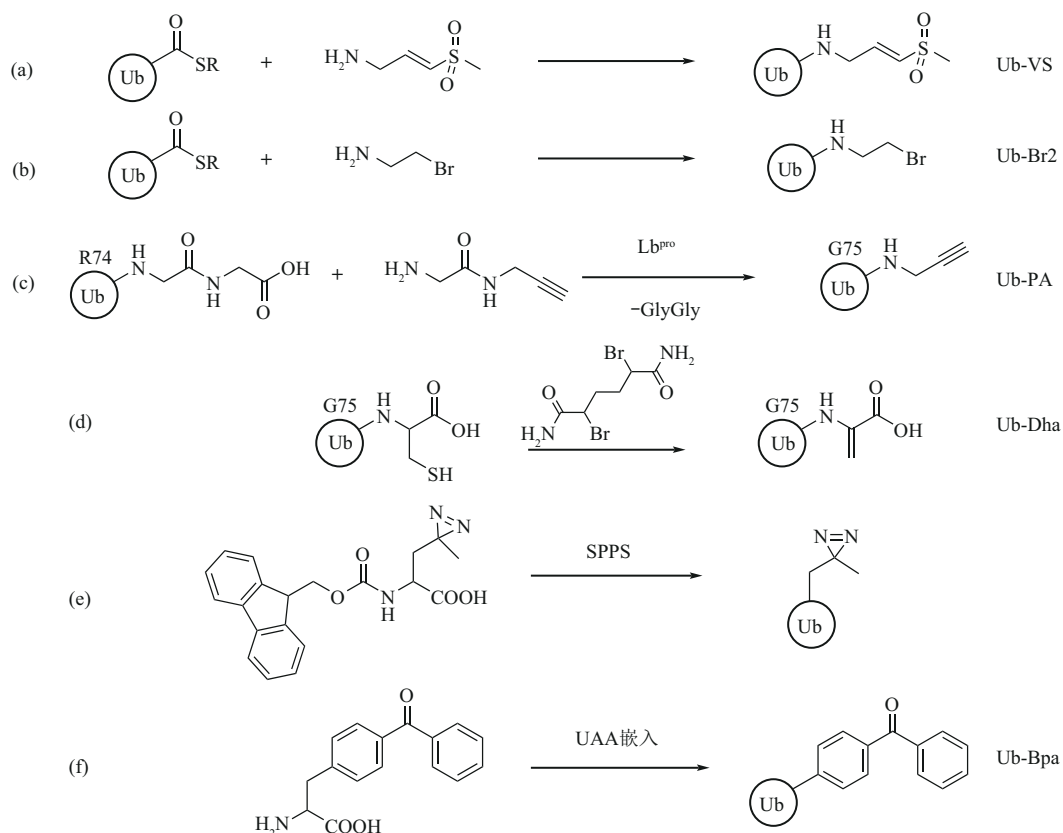


Fig. 7 Incorporation of chemically reactive groups

图7 化学反应基团的引入

(a) 通过直接氨解引入Michael受体基团获得Ub-VS探针。(b) 通过直接氨解引入溴原子获得Ub-Br2探针。(c) 通过手足口病毒蛋白酶合成Ub-PA探针。(d) 通过2,5-二溴己二酰胺消除巯基获得Ub-Dha探针。(e) 通过多肽固相合成法引入二氮丙啶基团。(f) 通过遗传密码子法嵌入二苯甲酮基团。

2 泛素化学探针的应用

2.1 发现及鉴定去泛素化酶

在目前已知的7种DUB家族中, 除JAMMs家族外, UCHs、USPs、MJDs、OTUs、ZUP1和MINDY家族活性位点都为Cys, 可被带有亲电基团的探针捕获。1987年, Hershko等^[83]发现Ubal对于游离Ub从泛素化底物中的释放具有显著抑制作用。1997年, Lam等^[16]通过Ub-CN探针从蛋白酶体的19S调节亚基中捕获到全新的DUB、UCH37^[84-85]。Borodovsky等^[17]在2001年报道了Ub-VS探针, 并从哺乳动物的26S蛋白酶体中捕获到USP14。随后, 更多针对DUB的活性探针被开

发出来, 包括HA-Ub-Cl、HA-Ub-Br2、HA-Ub-Br3、HA-Ub-VME、HA-Ub-VSPH和HA-Ub-VCN等 (图3)。2013年, Ekkebus等^[26, 86]报道了一种在泛素C端引入炔基的DUB探针Ub-Prg。该探针表现出了极强的对于催化Cys的选择性。2018年, Kwasna等^[87]和Haahr等^[88]分别独立利用该探针从细胞裂解液中捕获了一种新的DUB ZUSFP, 其被证明不属于任何一种已知的DUB家族。2020年, 该探针也被用于病原菌OTU家族DUB的筛查^[89]。

为研究DUB对泛素链的选择性切割, 一系列基于泛素二聚体的活性探针被开发出来, 这类探针也被称作基于泛素异肽键的活性探针 (ubiquitin Isopeptide activity-based probes, UIPP)。在2012

年, Iphöfer 等^[90] 设计并报道了 K48-UIPP 与 K63-UIPP 两种探针确定了多种 DUB 的作用偏好性。考虑到部分 DUB 的链选择性也依赖于对近端泛素模块构象的识别, 含有两个完整 Ub 单元的 di-Ub 探针随后也被开发出来。McGouran 等^[91] 在 2013 年利用叠氮基与炔基的点击化学反应制备了覆盖全部 8 种连接方式的 di-Ub 探针 (图 8a)。这些探针在细胞裂解液中共捕获到 29 种 DUB, 且表现出了较好的选择性。

针对非 Cys 依赖的 JAMM 家族 DUB, Hameed 等^[92] 于 2019 年报道了一种带有锌离子螯合剂 8-巯基喹啉的单泛素探针, 被证明可以抑制 26S 蛋白酶体中的 Rpn11, 同时也在 HeLa 细胞裂解液中捕获到了 POH1、AMSH 和 AMSH-LP 三种 JAMMs 家族的 DUB。

为捕获具有底物特异性的 DUB, 研究人员开发出了同时包含泛素化底物与泛素识别模块的探针。Meledin 等^[93] 合成了 α -globin-Ub-Dha 探针并成功在红细胞裂解液中筛查到了 USP15、USP14、USP5 和 UCHL3 可去除 α -globin 泛素化 (图 8b)。此外, 将 H2A-Ub-Dha 探针组装进核小体, 证明了可以捕获核小体 H2A K119 位点泛素化的特异性 DUB Calypso/ASX^[94]。最后, 基于二硫键的可逆交联型泛素工具已被证明可用于捕获 HeLa 细胞裂解液中的 DUB^[95]。此外, 为研究 DUB 在细胞内的定位, Gui 等^[96] 和 Mandal 等^[97] 研发出了带有细

胞穿透肽和荧光标记的单泛素工具。

2.2 解析去泛素化酶的工作机制

泛素化学探针也被广泛应用于阐明 DUB 的工作机制。1999 年 Johnston 等^[98] 利用 Ubal 解析了 YUH1-Ubal 复合物的结构。后来, Ubal (与 USP7^[99]、USP14^[100])、Ub-VME (与 UCHL3^[20]) 和 Ub-PA (vOTU^[26]、UCHL5^[21]、USP30^[101]) 也被广泛用于与多种 DUB 复合物的晶体结构解析, 并阐释了不同家族 DUB 催化域的特征结构。

多种链类型的二泛素结构探针被合成以研究 DUB 酶对于不同链型泛素链的选择性来源。Mevissen 等^[1] 构造了异肽键中含有麦氏受体的 K11 型二泛素探针, 与特异性识别 K11 型泛素链的 DUB Cezanne 交联以建立了反应模型 (图 8c)。随后, 他们使用了含有 Dha 结构的 M1 型二泛素探针获取了特异性识别 M1 型泛素链的 DUB OTULIN 交联复合物晶体结构^[102]。对于通过 S1、S2 口袋识别泛素链型的 DUB, Bekes 等^[103] 开发了含有端炔结构的 K48 型二泛素, 并获取了其木瓜样蛋白酶 PLpro 的复合物结构, 解释了 PLpro 对于 K48 型泛素链的识别与反应过程 (图 8d)。对于分叉型泛素链的识别特异性, Deol 等^[104] 合成了多种连接方式的分叉型三泛素模拟物, 解析了 DUB UCH37 介导的三泛素底物识别、去分叉化以及协同蛋白酶体降解底物的工作过程 (图 8e)。

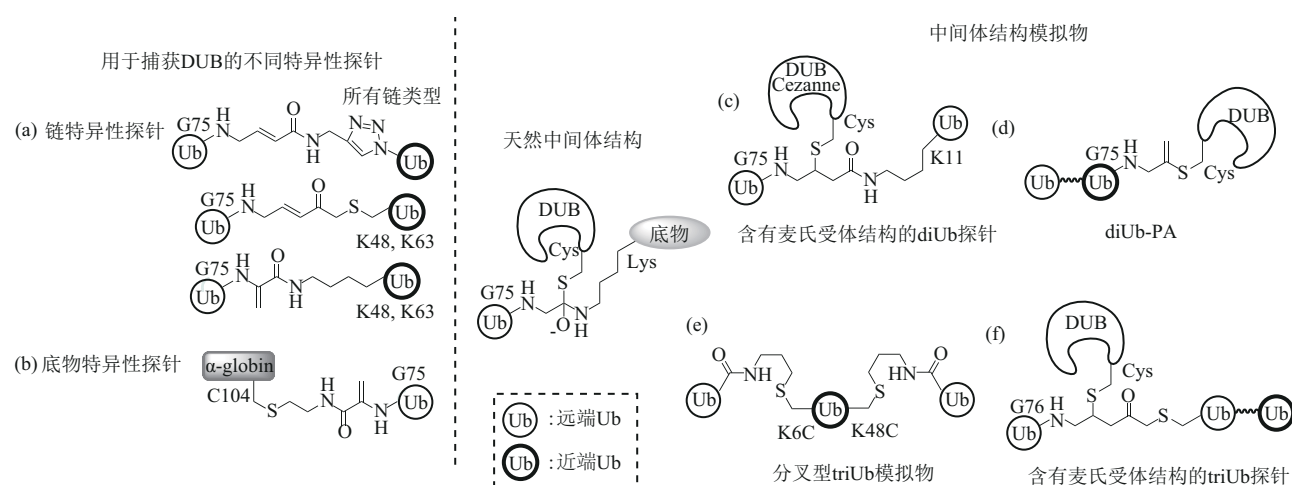


Fig. 8 Probes for capturing and studying DUB

图8 用于捕获DUB与解析工作机制的探针

用于捕获DUB的探针: (a) 针对不同泛素链类型的DUB探针; (b) 针对特定底物结构的DUB探针。用于解析DUB工作机制的探针: (c) 含有麦氏受体的二泛素探针可用于解释DUB对不同链型泛素链的选择性来源; (d) diUb-PA可用于解析DUB催化结构域; (e) 分叉型三泛素模拟物被用于解析DUB对于三泛素底物的作用过程; (f) 含有麦氏受体的三泛素探针被用于解释DUB特定反应方向的原因。

对于DUB对底物的特异性识别, 研究者合成了对应底物的泛素化模拟物用于形成复合物。如Morgan等^[72]模拟泛素化H2B的结构, 将模拟物组装为核小体, 并解析了其于DUB SAGA的复合物结构。有特定反应方向如内切或外切的DUB工作机制也通过泛素化学探针被解析。Paudel等^[105]分别合成了包含K11、K48和K63型三泛素结构的探针, 并将麦氏受体置于远端泛素与中间泛素的异肽键连接位置, 通过与DUB USP9X交联说明了USP9X对于不同链型的泛素链有多种特定的切割模式(图8f)。Zheng等^[73]通过双功能分子CAET合成了OTUD2-Ub-K27Ub作为K27型泛素链解耦联中间体模拟物, 揭示了DUB OTUD2中的ZnF结构域在裂解K27型泛素链时发挥的重要功能, 即结合K27型diUb受体泛素基团与定位被埋藏的异肽键。

2.3 发现及鉴定泛素化酶

泛素连接酶E3一般可分为4类: RING (really interesting new gene) 型、HECT (homologous to E6-AP carboxy terminus) 型、RBR (RING-between-RING) 型和RCR (RING-Cys-relay) 型。HECT型E3酶和RBR型E3由于含有活性Cys, 可

被活性探针捕获。其中, Ub-VME、Ub-VS被证明可用于捕获RBR型E3酶^[106-107], Ub-PA被证明可用于捕获HECT型E3酶(图9a)^[108]。为了通过E2-E3间的相互作用捕获E3酶, E2酶也被添加到探针的识别模块中。Pao等^[109]于2016年设计并合成了E2-Ub-AVS探针, 通过体外实验证明了其可被用于捕获帕金森病相关的RBR型E3酶PARKIN(图9b)。利用该探针进行体外活性检测, 研究者证明了仅当Ser65磷酸化泛素存在的情况下, Ubl结构域Ser65磷酸化的PARKIN才具有转硫酯活性。次年, Byrne等^[110]通过进一步研究证明了该工具也可用于NEDD4、UBE3C等HECT型E3酶的分析。

2018年, Pao等^[6]使用E2-Ub-AVS探针分析了神经母细胞瘤细胞提取物中分离得到的E3酶。在分析并获得了80%已知的HECT/RBR型E3酶的同时, 意外地富集到了MYCBP2。通过晶体学数据建立了其催化泛素转移至底物苏氨酸的工作模型: 该E3酶中含有两个催化Cys, 它们通过硫酯中间体“接力”将泛素转移至底物上。MYCBP2后来被归类为RING-Cys-relay (RCR) 型E3酶。

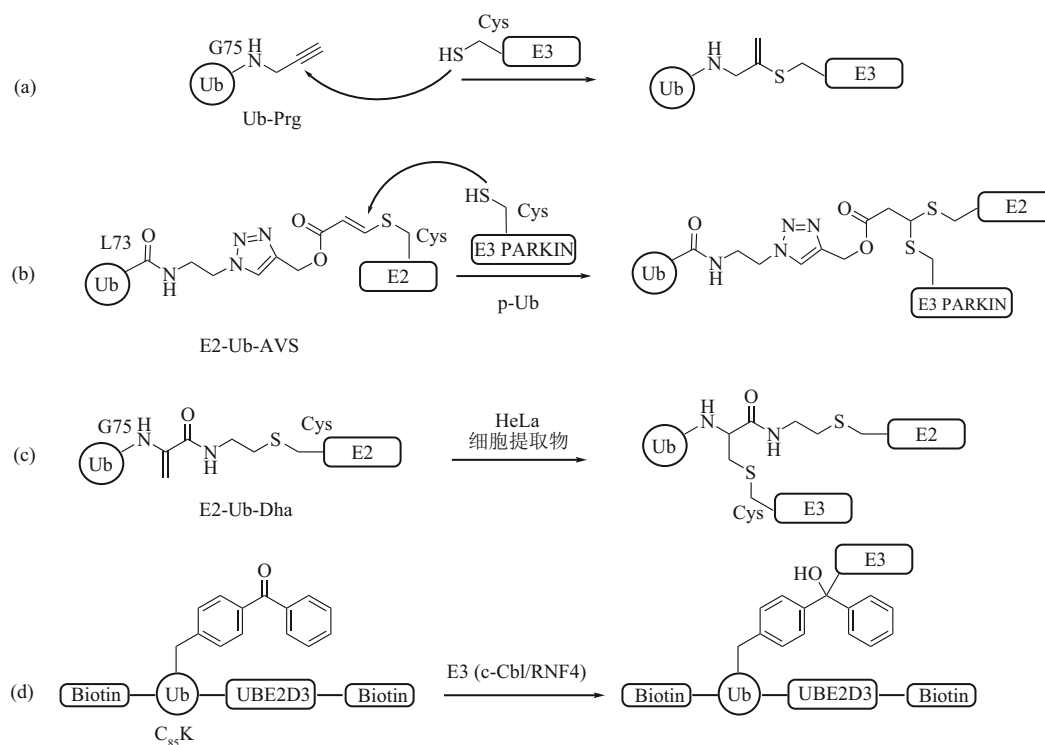


Fig. 9 Probes for capturing E3s

图9 用于捕获E3酶的探针

(a) Ub-Prg; (b) E2-Ub-AVS; (c) E2-Ub-Dha; (d) 含有二苯甲酮基团的E2-Ub光交联探针。

含有 E2-Ub 结构的活性探针同样可以用于筛查 RBR 型和 HECT 型 E3 酶。Xu 等^[111] 于 2019 年设计并合成了 E2-Ub-Dha 探针，其在 HeLa 细胞裂解液中成功筛查到了包括 NEDD4、UBE3C、和 UBR5 在内的多种 HECT 型 E3 酶以及两种 RBR 型 E3 酶 ARIH1 与 ARIH2 (图 9c)。由于 RING 型 E3 酶中不含有活性 Cys 侧链，无法与活性探针中的亲电基团反应，研究人员往往通过在探针中插入光交联基团的方式来捕获 RING 型 E3 酶 (图 9d)。在 Virdee 等^[28] 于 2020 年设计的 E2-Ub 光交联探针中，Bpa 被嵌入到泛素基团的 Q31 处。该探针已被用于 HEK293T 细胞裂解液中 RING 型 E3 酶的筛查。

2.4 追踪泛素级联反应

人体内的泛素级联修饰系统十分复杂，准确监测这样复杂的动态酶系统是相关研究领域的重要需求。Mulder 等^[19] 于 2016 年设计了一种泛素化学探针 Ub-Dha，并证明了该探针可用于直接追踪 E1-E2-E3 泛素修饰系统的级联过程。由于结构与泛素相似，该探针可以在 E1 酶的作用下消耗 ATP 并生成活化的 UbDha-AMP 中间体，并由此进入级联反

应。该探针成功地从 HeLa 细胞裂解液中捕获到 2 种 E1 酶 (UBE1 与 UBA6)，19 种 E2 酶及 2 种 E3 酶 (UBE3A 和 HECTD1)。在后续实验中，研究者利用相似的方法合成了 NEDD8Dha 探针，并证明了此类 Ub1 探针同样可用于追踪相应的级联反应。研究者还利用电穿孔技术将带有荧光标记的 Cy5-UbDha 导入 HeLa 细胞中，实现了活细胞内级联酶活性的监测及级联酶的定位。

2.5 解析泛素化过程的酶学机制

E1 酶激活泛素的机制被较早探明：利用 E1-ATP 复合物的晶体数据，研究者解析了泛素腺苷酸化过程的机制^[112]。E1 内部转硫酯过程及 Ub 向 E2 转移过程的机制则较晚被阐明：Hann 等^[113] 合成了 Ub-AMSN 和 Ub-AVSN 两种 Ub-AMP 模拟物探针并分别使之与 E1 酶结合或交联，由此获得了复合物释放焦磷酸前与形成硫酯键时的两种构象；Yuan 等^[114] 则通过构建 E1-Ub-E2 三元模拟复合物观察到了泛素与 E1、E2 酶接触时采取的不同构象，从而揭示了 Ub 转移的机制 (图 10)。

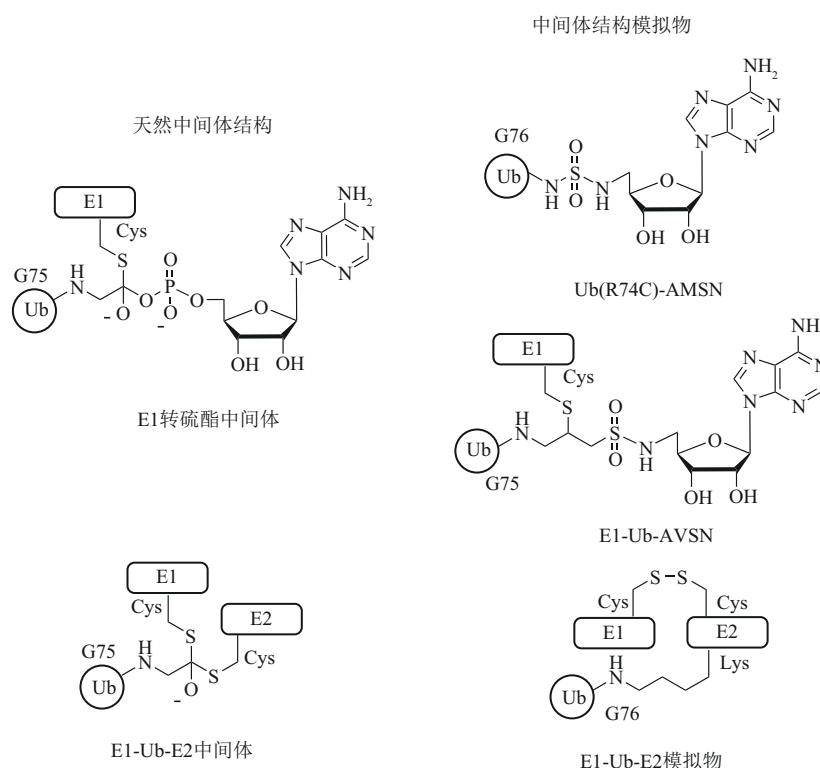


Fig. 10 Probes for studying E1s

图10 解析E1酶工作机制的探针

Ub-AMSN和Ub-AVSN两种Ub-AMP模拟物探针可用于解析E1内部转硫酯过程及Ub向E2转移过程。E1-Ub-E2三元模拟复合物则可解析泛素转移机制。

含高能硫酯键的E2-Ub中间体不稳定, 难以直接获取。因此, 研究人员一般利用以氧酯键、二硫键、硫醚键或异肽键连接的E2-Ub模拟物进行机制与结构的研究(图11)。例如, E2酶与UbG76C通过二硫键连接或与Ub-Dha探针通过硫醚键连接产生的复合物都被证明可用于E2-Ub构象的研究^[19, 115-116]。此外, 在E1酶的作用下, 活性Cys突变为Ser的E2酶UBCH5B可与Ub形成以氧酯键连

接的E2-Ub模拟物。利用该模拟物与HECT型E3酶NEDD4L或RING型E3酶BIRC7形成的复合物晶体, 研究者阐释了Ub从E2向E3传递的机制^[117-118]。同理, 催化Cys突变为Lys的E2酶可与Ub通过异肽键相连。利用此类模拟物, 研究者获取了E2-Ub与RING型E3酶RNF4及RBR型E3酶HOIP形成的复合物的结构^[119-120]。

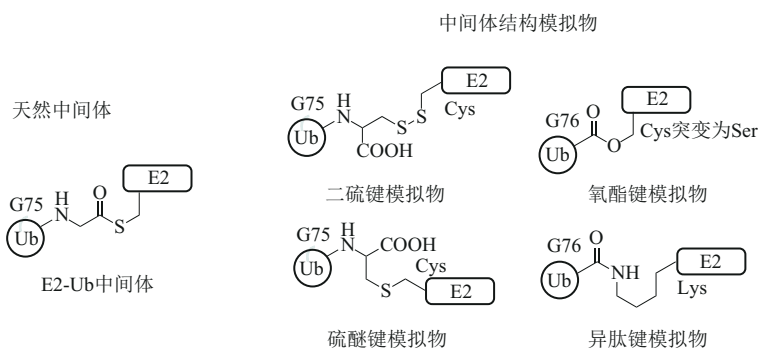


Fig. 11 Probes for studying E2s

图11 解析E2酶工作机制的探针

二硫键、氧酯键、硫醚键、异肽键一般被用于模拟天然E2-Ub中间体中不稳定的硫酯结构。

HECT、RBR和RCR型E3酶的工作机制包含两个步骤: 将泛素从E2的催化Cys转移至E3的催化Cys, 以及将泛素从E3的催化Cys转移至底物的待修饰位点。为了研究步骤一, Polo等^[121]通过将UbG76C与HECT型E3酶NEDD4中催化中心的Cys的活性巯基通过二硫键连接, 获取了E3-Ub的复合物结构, Nair等^[108]则解析了Ub-PA与HECT型E3酶HUWE1的复合结构。为了在复合物中引入E2结构以观察更贴近实际的转硫酯中间体结构, 研究者使用以硫醚键连接的E2-Ub模拟物E2_{Dap}-Ub_{Dha}分别与E3酶NEDD4(HECT型)和PARKIN(RBR型)交联, 并通过复合物的化学交联质谱获知了转硫酯过程中蛋白质的相互作用信息^[122]。对于RCR型E3酶, Mabbitt等^[123]利用E2-Ub-AVS探针捕获了MYCBP2并解析了复合物的晶体结构, 从而阐明了反应中MYCBP2的构象重排过程。在第二个催化步骤中, 底物与E3-Ub复合物间的相互作用往往较为短暂, 利用E3-Ub活性探针直接捕获底物的难度也因此大大增加。为解决该问题, 研究人员开发了顺次交联复合物中各组分的方法。Kamadurai等^[124]在底物Sna3的泛素化位点处引入叠氮基团, 并利用点击化学反应使其与探针偶联。

该探针上同时装载有双马来酰胺手臂, 从而可继续与UbG76C及E3酶Rsp5中的Cys反应并连接。利用该方法, 研究人员解析了E3-Ub-底物三元复合物的结构(图12)。

RING型E3酶通过构象变化将E2-Ub中的泛素直接转移到底物上, 且不含可供交联的活性Cys侧链。Brown等^[125-127]使用一种含三个马来酰胺基团的探针与UBG76C、泛素化位点突变为Cys的底物及E2酶的催化Cys分别交联, 由此获取了E2-Ub-底物三元复合物的模拟物。研究人员通过冷冻电镜解析了该模拟物的结构, 并以此为出发点获取了E3酶APC/C在释放抑制蛋白、介导底物泛素化和介导泛素链延伸过程中的结构信息(图13a)。

利用二硫键交联得到的模拟复合物也可用于研究RING型E3酶的工作机制。Cullin-RING E3(CRL)是一类在真核生物中调节转录、细胞分裂等多种生理过程的泛素连接酶。其中, Cullins(CULs)通过一个保守的相互作用域Cullin/RBX(C/R)结合其同源的含有RING的伴侣RBX, 同时利用N端结构域结合用于招募底物的蛋白质^[128]。CRLs已知受到类泛素蛋白NEDD8的调控。Baek等^[129]先将泛素硫酯与底物N端的Cys通过NCL反

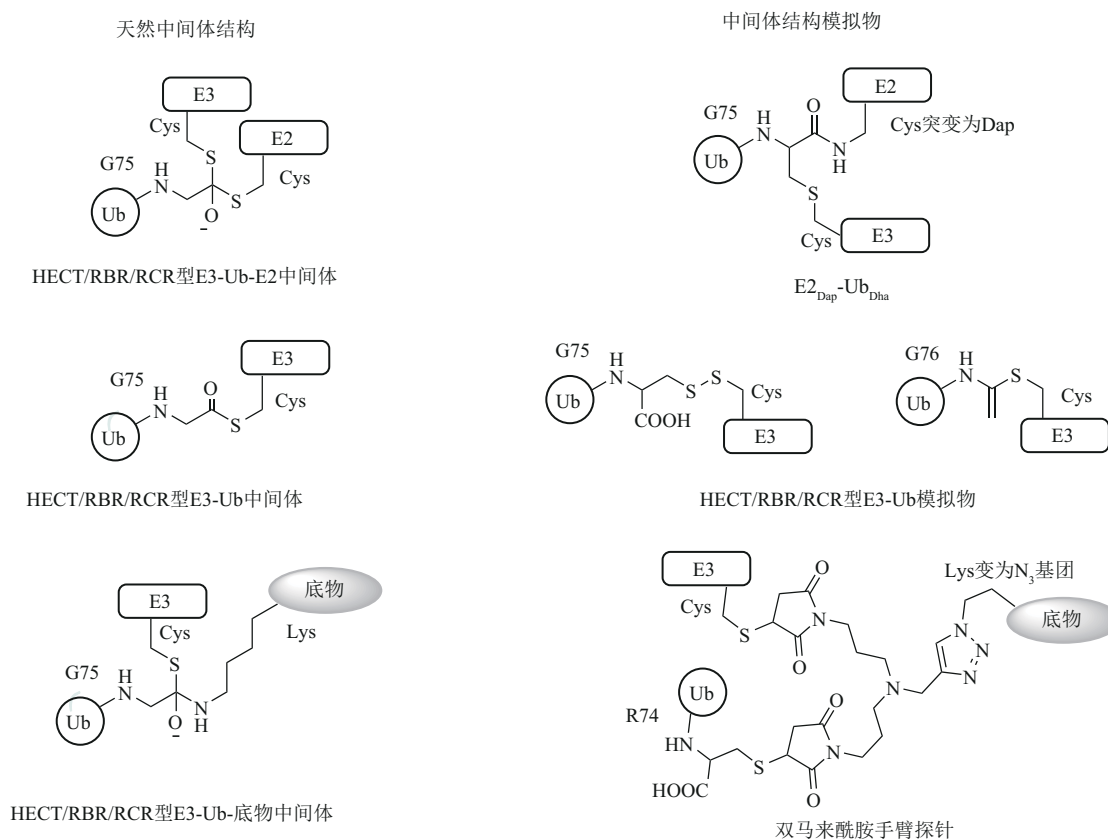


Fig. 12 Probes for studying E3s (HECT/RBR/RCR)

图12 解析HECT/RBR/RCR型E3酶工作机制的探针

E2_{Dap}-Ub_{Dha}与HECT/RBR型E3酶交联而可用于模拟E3-Ub-E2中间体。UbG76C与Ub-PA被用于与HECT型E3交联以解析中间体结构。装载双马来酰肼手臂的探针可用于分别交联底物、E3与泛素。

应连接, 再将该Cys与E2酶的催化Cys通过二硫键连接, 从而获取了E2-Ub-底物复合物的模拟物。利用此类模拟物, 研究者阐释了NEDD8修饰的CRL1-β-TRCP蛋白复合物通过一系列相互作用促进泛素从UBE2D家族E2酶向底物转移的机制(图13b)。

除解析E3酶介导的单泛素化过程外, 研究人员进一步探究了单亚基E3酶通过单一E2偶联酶介导泛素化的起始与延伸、E3-E3复合体介导的协同泛素化、多聚泛素链的合成机理等较复杂系统的工作机制。Ubr1是一种单亚基的E3连接酶, 参与Arg/N-Degron降解途径。Pan等^[130]通过化学合成的方法将Degron肽的K17氨基与Cys相连, 随后利用NCL反应将此Cys与泛素相连, 最后再通过二硫键将该Cys的侧链与E2酶连接, 形成了含二硫键的泛素链起始阶段的反应中间体模拟物。通过单颗粒低温电子显微镜解析, 观察到了类似帆船的复合物整体结构。为获得链延伸阶段Ubc2-Ub-Ub-

Degron中间体的模拟物, 首先使用小分子CAET与E2酶和泛素硫酯分别交联, 从而形成了E2-Ub模拟物结构。随后, 通过二硫键将化学合成的UbK48C-K17 Degron底物与CAET上游离的巯基相连, 成功获取了以二硫键连接的Ubc2-Ub-Ub-Degron中间体模拟物。通过单颗粒冷冻电镜解析, 观察到了泛素化过程中从起始到延伸阶段的结构迁移过程, 从而提出了Ubr1在链延伸阶段的工作机制(图13c, d)。

对于CUL1和ARIH1(RBR型)组装形成的E3-E3复合体的协同泛素化工作机制, Horn-Ghetko等^[131]运用多种泛素化学探针进行研究, 包括通过异肽键连接的E2-Ub、含有麦氏受体的E2-Ub与ARIH1活性Cys的交联复合物、Ub-VME与ARIH1的交联复合物以及通过Dha模拟异肽键的泛素化底物与ARIH1交联复合物。综合以上多种复合物的结构信息阐释了CUL1与ARIH1协同进行底物泛素化的工作机制。

K48型的泛素链标记可以令底物被蛋白酶体降解, 然而该多聚泛素链的合成机理最近才被解析。研究者首先将E2酶UBE2K与泛素通过异肽键连接形成E2-Ub结构, 随后将UBE2K催化中心周围的Asp突变为Cys, 与将其与底物K48二泛素上的

K48C通过双马来酰胺试剂BMOE交联, 从而获取了Ub-E2-diUbK48的泛素链延伸反应中间体, 通过解析其与E3酶RNF38形成的复合物晶体结构, 阐释了UbE2K特异性催化泛素链延伸反应生成K48型泛素链的工作机制^[132] (图13e)。

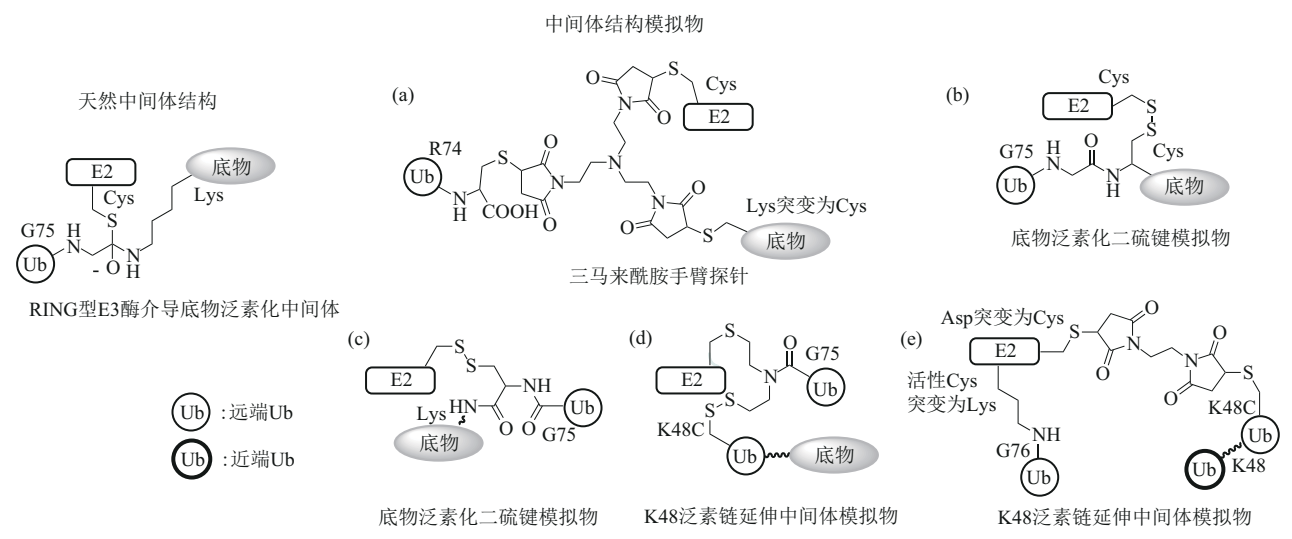


Fig. 13 Probes for studying E3s (RING)

图13 解析RING型E3酶工作机制的探针

(a) 三马来酰胺手臂连接的E2-Ub-底物中间体模拟物; (b) 二硫键交联E2-底物模拟泛素化中间体; (c) CAET小分子辅助的二硫键交联获得泛素化中间体; (d) CAET小分子辅助的二硫键交联获得Ub₂-Ub-Ub-Degron结构解析泛素链延伸机制; (e) Ub-E2-diUbK48中间体解析K48型泛素链延伸结构。

3 总结与展望

本文总结了近期泛素化学探针的发展与应用, 同时强调了发展新技术、新概念对于研究日趋复杂的泛素生物学的必要性 (图14)。研究愈深入, 研究者愈发认识到泛素系统参与生理过程之广泛、信号功能之全面、作用机制之复杂。非经典泛素链、混合泛素链与分叉泛素链的功能被逐渐发现, 然而研究者对于此类泛素链参与的生理过程与作用机制

知之甚少。越来越多的E3酶被认知, 而难以指出其作用的特定底物, 对于种类繁多的E3酶与DUB结构特异性的作用过程理解不足。靶向E3酶的肽类蛋白水解靶向嵌合体 (peptidic proteolysis-targeted chimeras, PROTACs) 与分子胶 (molecular glue) 药物开发为癌症、神经退行性疾病与免疫类疾病提供了新的研究方向, 该领域的发展离不开更加合理系统的方法, 包括对于泛素化过程的结构研究。为了继续探索泛素系统, 仍然需要

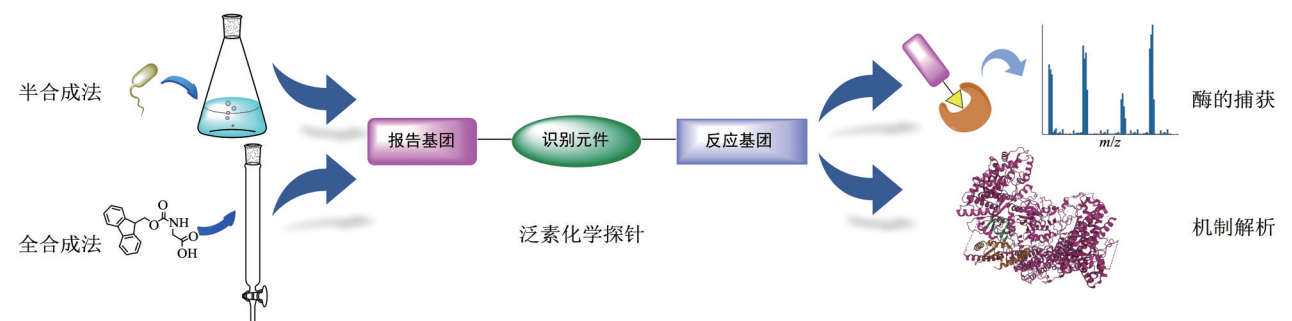


Fig. 14 Acquisition and application of Ub probes

图14 泛素化学探针的合成与应用

泛素化学探针主要可通过化学全合成法与半合成法获得, 可用于泛素相关酶的捕获与工作机制解析 (PDB ID 7MEX^[130])。

发展、设计结构更丰富、合成效率更高及应用范围更广的泛素化学探针。

参 考 文 献

- [1] Mevissen T E T, Kulathu Y, Mulder M P C, *et al.* Molecular basis of Lys11-polyubiquitin specificity in the deubiquitinase Cezanne. *Nature*, 2016, **538**(7625): 402-405
- [2] Haakonsen D L, Rape M. Branching out: improved signaling by heterotypic ubiquitin chains. *Trends Cell Biol*, 2019, **29**(9): 704-716
- [3] Stolz A, Dikic I. Heterotypic ubiquitin chains: seeing is believing. *Trends Cell Biol*, 2018, **28**(1): 1-3
- [4] Swatek K N, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 2016, **26**(4): 399-422
- [5] Bhogaraju S, Kalayil S, Liu Y, *et al.* Phosphoribosylation of ubiquitin promotes serine ubiquitination and impairs conventional ubiquitination. *Cell*, 2016, **167**(6): 1636-1649.e1613
- [6] 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
- [7] Cadwell K, Coscoy L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science*, 2005, **309**(5731): 127-130
- [8] Otten E G, Werner E, Crespillo-Casado A, *et al.* Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection. *Nature*, 2021, **594**(7861): 111-116
- [9] Yau R, Rape M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol*, 2016, **18**(6): 579-586
- [10] Schmidt M F, Gan Z Y, Komander D, *et al.* Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ*, 2021, **28**(2): 570-590
- [11] Senft D, Qi J, Ronai Z A. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2018, **18**(2): 69-88
- [12] Lee Y R, Chen M, Lee J D, *et al.* Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science*, 2019, **364**: 6441
- [13] Arakhamia T, Lee C E, Carlomagno Y, *et al.* Posttranslational modifications mediate the structural diversity of tauopathy strains. *Cell*, 2021, **184**(25): 6207-6210
- [14] Dujardin S, Commins C, Lathuiliere A, *et al.* Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2020, **26**(8): 1256-1263
- [15] Wesseling H, Mair W, Kumar M, *et al.* Tau PTM profiles identify patient heterogeneity and stages of Alzheimer's disease. *Cell*, 2020, **183**(6): 1699-1713.e1613
- [16] 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
- [17] 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
- [18] Hemelaar J, Borodovsky A, Kessler B M, *et al.* Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(1): 84-95
- [19] Mulder M P, 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
- [20] Misaghi S, Galaray P J, Meester W J, *et al.* Structure of the ubiquitin hydrolase UCH-L3 complexed with a suicide substrate. *J Biol Chem*, 2005, **280**(2): 1512-1520
- [21] 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
- [22] Olsen S K, Capili A D, Lu X, *et al.* Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1. *Nature*, 2010, **463**(7283): 906-912
- [23] Sui X, Wang Y, Du Y X, *et al.* Development and application of ubiquitin-based chemical probes. *Chem Sci*, 2020, **11**(47): 12633-12646
- [24] Borodovsky A, Ovaa H, Kolli N, *et al.* Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme. *Chem Biol*, 2002, **9**(10): 1149-1159
- [25] 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
- [26] 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
- [27] Sommer S, Weikart N D, Linne U, *et al.* Covalent inhibition of SUMO and ubiquitin-specific cysteine proteases by an *in situ* thiol-alkyne addition. *Bioorg Med Chem*, 2013, **21**(9): 2511-2517
- [28] 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.e76
- [29] Zhang Y, Hirota T, Kuwata K, *et al.* Chemical synthesis of atomically tailored SUMO E2 conjugating enzymes for the formation of covalently linked SUMO-E2-E3 ligase ternary complexes. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(37): 14742-14751
- [30] 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**: 10589
- [31] 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
- [32] 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*, 2017, **15**: 14
- [33] Kumar K S A, Spasser L, Erlich L A, *et al.* Total chemical synthesis of di-ubiquitin chains. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, **49**(48): 9126-9131
- [34] Mulder M P, 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
- [35] Mulder M P C, Merkx R, Witting K F, *et al.* Total chemical synthesis of SUMO and SUMO-based probes for profiling the activity of SUMO-specific proteases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(29): 8958-8962
- [36] 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
- [37] 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
- [38] Shi J X, 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
- [39] 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
- [40] 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
- [41] Zheng Q, Wang T, Chu G C, *et al.* An E1-catalyzed chemoenzymatic strategy to isopeptide-N-ethylated deubiquitylase-resistant ubiquitin probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, **59**(32): 13496-13501
- [42] Burchak O N, Jaquinod M, Cottin C, *et al.* Chemoenzymatic ubiquitination of artificial substrates. *Chembiochem*, 2006, **7**(11): 1667-1669
- [43] El Oualid F, Merkx R, Ekkebus R, *et al.* Chemical synthesis of ubiquitin, ubiquitin-based probes, and diubiquitin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, **49**(52): 10149-10153
- [44] Pan M, Zheng Q Y, Gao S, *et al.* Chemical synthesis of structurally defined phosphorylated ubiquitins suggests impaired Parkin activation by phosphorylated ubiquitins with a non-phosphorylated distal unit. *CCS Chemistry*, 2019, **1**(5): 476-489
- [45] Gao S, Pan M, Zheng Y, *et al.* Monomer/oligomer quasi-racemic protein crystallography. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(43): 14497-14502
- [46] 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
- [47] Fang G M, Li Y M, Shen F, *et al.* Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(33): 7645-7649
- [48] 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
- [49] 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
- [50] Pan M, Zheng Q, Ding S, *et al.* Chemical protein synthesis enabled mechanistic studies on the molecular recognition of K27-linked ubiquitin chains. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(9): 2627-2631
- [51] Lan H, Wu K, Zheng Y, *et al.* Total synthesis of mambalgin-1/2/3 by two-segment hydrazide-based native chemical ligation. *J Pept Sci*, 2016, **22**(5): 320-326
- [52] Li Y M, Li Y T, Pan M, *et al.* Irreversible site-specific hydrazinolysis of proteins by use of sortase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(8): 2198-2202
- [53] 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
- [54] Weller C E, Huang W, Chatterjee C. Facile synthesis of native and protease-resistant ubiquitylated peptides. *Chembiochem*, 2014, **15**(9): 1263-1267
- [55] 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
- [56] 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
- [57] 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
- [58] Ajish Kumar K S, Haj-Yahya M, Olschewski D, *et al.* Highly efficient and chemoselective peptide ubiquitylation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(43): 8090-8094
- [59] Yang R, Pasunooti K K, Li F, *et al.* Dual native chemical ligation at lysine. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(38): 13592-13593
- [60] 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 Int Ed Engl*, 2017, **56**(43): 13333-13337
- [61] 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
- [62] Castaneda 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
- [63] Qi Y K, Si Y Y, Du S S, *et al.* Recent advances in the chemical synthesis and semi-synthesis of poly-ubiquitin-based proteins and probes. *Sci China Chem*, 2019, **62**(3): 299-312
- [64] Thompson R E, Muir T W. Chemoenzymatic semisynthesis of proteins. *Chem Rev*, 2020, **120**(6): 3051-3126
- [65] Mali S M, Singh S K, Eid E, *et al.* Ubiquitin signaling: chemistry comes to the rescue. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(14): 4971-4986
- [66] Qi Y K, Ai H S, Li Y M, *et al.* Total chemical synthesis of modified histones. *Front Chem*, 2018, **6**: 19
- [67] Lu L N, Guo Y, Wang T, *et al.* Inactivity of YGL082W *in vitro* due to impairment of conformational change in the catalytic center loop. *Sci China Chem*, 2020, **63**(2): 237-243
- [68] 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
- [69] 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
- [70] 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
- [71] 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
- [72] 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
- [73] 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
- [74] Zhao X, Lutz J, Hollmuller E, *et al.* Identification of proteins interacting with ubiquitin chains. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, **56**(49): 15764-15768
- [75] Lutz J, Hollmuller E, Scheffner M, *et al.* The length of a ubiquitin chain: a general factor for selective recognition by ubiquitin-binding proteins. Angew Chem Int Ed Engl, 2020, **59**(30): 12371-12375
- [76] 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
- [77] 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
- [78] 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
- [79] Li G, Liang Q, Gong P, *et al.* Activity-based diubiquitin probes for elucidating the linkage specificity of deubiquitinating enzymes. Chem Commun (Camb), 2014, **50**(2): 216-218
- [80] Wang T, Li C, Wang M, *et al.* Expedient synthesis of ubiquitin-like protein ISG15 tools through chemo-enzymatic ligation catalyzed by a viral protease Lbpro. Angew Chem Int Ed Engl, 2022, **61**(40): e202206205
- [81] 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
- [82] 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, **56**(10): 2744-2748
- [83] Hershko A, Rose I A. Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**(7): 1829-1833
- [84] Holzl H, Kapelari B, Kellermann J, *et al.* The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. J Cell Biol, 2000, **150**(1): 119-130
- [85] Li T W, Naqvi N I, Yang H Y, *et al.* Identification of a 26S proteasome-associated UCH in fission yeast. Biochem Biophys Res Commun, 2000, **272**(1): 270-275
- [86] Mons E, Kim R Q, Van Doodewaerd B R, *et al.* Exploring the versatility of the covalent thiol-alkyne reaction with substituted propargyl warheads: a deciding role for the cysteine protease. J Am Chem Soc, 2021, **143**(17): 6423-6433
- [87] Kwasna D, Abdul Rehman S A, Natarajan J, *et al.* Discovery and characterization of ZUFSP/ZUP1, a distinct deubiquitinase class important for genome stability. Mol Cell, 2018, **70**(1): 150-164. e156
- [88] Haahr P, Borgermann N, Guo X H, *et al.* ZUFSP deubiquitylates K63-linked polyubiquitin chains to promote genome stability. Mol Cell, 2018, **70**(1): 165-174. e6
- [89] Schubert A F, Nguyen J V, Franklin T G, *et al.* Identification and characterization of diverse OTU deubiquitinases in bacteria. EMBO J, 2020, **39**(15): e105127
- [90] 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
- [91] 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
- [92] Hameed D S, Sapmaz A, Burggraaff L, *et al.* Development of ubiquitin-based probe for metalloprotease deubiquitinases. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, **58**(41): 14477-14482
- [93] Meledin R, Mali S M, Kleinfeld O, *et al.* Activity-based probes developed by applying a sequential dehydroalanine formation strategy to expressed proteins reveal a potential α -globin-modulating deubiquitinase. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, **57**(20): 5645-5649
- [94] Jbara M, Laps S, Morgan M, *et al.* Palladium prompted on-demand cysteine chemistry for the synthesis of challenging and uniquely modified proteins. Nat Commun, 2018, **9**(1): 3154
- [95] De Jong A, Witting K, Kooij R, *et al.* Release of enzymatically active deubiquitinating enzymes upon reversible capture by disulfide ubiquitin reagents. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, **56**(42): 12967-12970
- [96] Gui W J, 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
- [97] 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
- [98] 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
- [99] Hu M, Li P, Li M, *et al.* Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. Cell, 2002, **111**(7): 1041-1054

- [100] Hu M, Li P, Song L, *et al.* Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J*, 2005, **24**(21): 3747-3756
- [101] 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
- [102] Weber A, Elliott P R, Pinto-Fernandez A, *et al.* A linear diubiquitin-based probe for efficient and selective detection of the deubiquitinating enzyme OTULIN. *Cell Chem Biol*, 2017, **24**(10): 1299-1313.e1297
- [103] Bekes M, Van Noort G J V, Ekkebus R, *et al.* Recognition of Lys48-linked di-ubiquitin and deubiquitinating activities of the SARS coronavirus papain-like protease. *Mol Cell*, 2016, **62**(4): 572-585
- [104] Deol K K, Crowe S O, Du J, *et al.* Proteasome-bound UCH37/UHL5 debranches ubiquitin chains to promote degradation. *Mol Cell*, 2020, **80**(5): 796-809.e799
- [105] 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
- [106] Kelsall I R, Duda D M, Olszewski J L, *et al.* TRIAD1 and HHARI bind to and are activated by distinct neddylated Cullin-RING ligase complexes. *EMBO J*, 2013, **32**(21): 2848-2860
- [107] Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO J*, 2013, **32**(15): 2099-2112
- [108] 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
- [109] Pao K C, Stanley M, Han C, *et al.* Probes of ubiquitin E3 ligases enable systematic dissection of Parkin activation. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(5): 324-331
- [110] Byrne R, Mund T, Licchesi J D F. Activity-based probes for HECT E3 ubiquitin ligases. *Chembiochem*, 2017, **18**(14): 1415-1427
- [111] 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 (Camb)*, 2019, **55**(49): 7109-7112
- [112] Schulman B A, Harper J W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(5): 319-331
- [113] Hann Z S, Ji C, Olsen S K, *et al.* Structural basis for adenylation and thioester bond formation in the ubiquitin E1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(31): 15475-15484
- [114] Yuan L, Lv Z, Adams M J, *et al.* Crystal structures of an E1-E2-ubiquitin thioester mimetic reveal molecular mechanisms of transthioesterification. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 2370
- [115] Merkley N, Barber K R, Shaw G S. Ubiquitin manipulation by an E2 conjugating enzyme using a novel covalent intermediate. *J Biol Chem*, 2005, **280**(36): 31732-31738
- [116] Serniwwa S A, Shaw G S. The structure of the UbcH8-ubiquitin complex shows a unique ubiquitin interaction site. *Biochemistry*, 2009, **48**(51): 12169-12179
- [117] Dou H, Buetow L, Sibbet G J, *et al.* BIRC7-E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(9): 876-883
- [118] Kamadurai H B, Souphron J, Scott D C, *et al.* Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex. *Mol Cell*, 2009, **36**(6): 1095-1102
- [119] Lechtenberg B C, Rajput A, Sanishvili R, *et al.* Structure of a HOIP/E2~ubiquitin complex reveals RBR E3 ligase mechanism and regulation. *Nature*, 2016, **529**(7587): 546-550
- [120] Plechanovova A, Jaffray E G, Tatham M H, *et al.* Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature*, 2012, **489**(7414): 115-120
- [121] Maspero E, Valentini E, Mari S, *et al.* Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(6): 696-701
- [122] 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 transthioylation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, **60**(31): 17171-17177
- [123] Mabbitt P D, Loreto A, Dery 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
- [124] Kamadurai H B, Qiu Y, Deng A, *et al.* Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *Elife*, 2013, **2**: e00828
- [125] Brown N G, Vanderlinden R, Watson E R, *et al.* RING E3 mechanism for ubiquitin ligation to a disordered substrate visualized for human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(17): 5272-5279
- [126] Brown N G, Vanderlinden R, Watson E R, *et al.* Dual RING E3 architectures regulate multiubiquitination and ubiquitin chain elongation by APC/C. *Cell*, 2016, **165**(6): 1440-1453
- [127] Yamaguchi M, Vanderlinden R, Weissmann F, *et al.* Cryo-EM of mitotic checkpoint complex-bound APC/C reveals reciprocal and conformational regulation of ubiquitin ligation. *Mol Cell*, 2016, **63**(4): 593-607
- [128] Harper J W, Schulman B A. Cullin-RING ubiquitin ligase regulatory circuits: a quarter century beyond the F-box hypothesis. *Annu Rev Biochem*, 2021, **90**: 403-429
- [129] Baek K, Krist D T, Prabu J R, *et al.* NEDD8 nucleates a multivalent cullin-RING-UBE2D ubiquitin ligation assembly. *Nature*, 2020, **578**(7795): 461-466
- [130] Pan M, Zheng Q, Wang T, *et al.* Structural insights into Ubr1-mediated N-degron polyubiquitination. *Nature*, 2021, **600**(7888): 334-338
- [131] 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
- [132] Nakasone M A, Majorek K A, Gabrielsen M, *et al.* Structure of UBE2K-Ub/E3/polyUb reveals mechanisms of K48-linked Ub chain extension. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**(4): 422-431

Chemical Probes Targeting Ubiquitination and Deubiquitination Enzymes*

LIANG Jia-Wei¹⁾, WU Shi-Dian¹⁾, WANG Tian^{1)**}, ZHENG Qing-Yun^{1,2)**}

⁽¹⁾Ministry of Education Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology, Department of Chemistry,

Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾Institute of Translational Medicine, National Center for Translational Medicine (Shanghai), Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Protein ubiquitination is one of the most important post-translational modifications in eukaryotes, which controls many key fate-decision processes in cells from division to death. Ubiquitin dynamics and homeostasis are strictly regulated by E1-E2-E3 cascade enzymatic system which add ubiquitin to substrate proteins through activating, conjugating and ligating steps, and reversely regulated by deubiquitinases that release conjugated ubiquitin from substrate proteins. In human, there are approximately 100 deubiquitinating enzymes, 2 E1 enzymes, 40 E2 enzymes and more than 600 E3 ligases, which form a balanced but complex system remain to be unraveled. Chemical probes targeting ubiquitination systems and deubiquitinases have emerged as a powerful technique to profile these important proteins and especially extensively extend our knowledge about the molecular mechanism of ubiquitination process. This review aims to summarize basic design principles and synthetic methods for the chemical probes as well as their biological applications. In the first part, we define the composition of chemical probes including the reporter tag, recognition module and reactive group, which can be classified further based on the reaction principles of different reactive groups. Then we summarize previously synthetic and ligation strategies of recognition modules by total chemical synthesis and semi-synthesis, and detailed methods for the incorporation of reactive groups. In the second part, we highlight various biological applications for these probes. For profiling deubiquitinases, different scaffolds such as mono-ubiquitin and di-ubiquitin were designed based on their mode of action, with the hand of these probes, great progress has been made in the study of the multi-layer regulation of deubiquitinases controlling chain length, cleavage direction, linkage type, and substrate specificity. Furthermore, we discuss recent work that has brought a giant leap in the identification and/or mechanistic characterization of E3 ligases illuminated by activity-based chemical probes. Exquisite structural designs help to capture E3 ligases in different catalytic states and novel ubiquitin transfer mechanisms were visualized by structural biology. We anticipate great expansion of knowledge in catalytic mechanism of E3 ligases from these chemical probes, facilitating the theory-driven drug discovery and, in particular, paving the way for highly attractive technologies such as proteolysis-targeting chimeras (PROTACs).

Key words post-translational modifications, ubiquitin, ubiquitin chemical probes

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0569

* This work was supported by grants from the National Postdoctoral Program for Innovative Talents (BX2021143), China Postdoctoral Science Foundation (2021M701868), and Shuimu Tsinghua Scholar Program (2021SM067).

** Corresponding author.

ZHENG Qing-Yun. Tel: 86-18811368446, E-mail: qyz@mail.tsinghua.edu.cn

WANG Tian. Tel: 86-13021256470, E-mail: Tian.Wang@childrens.harvard.edu

Received: December 18, 2022 Accepted: February 23, 2023