

蛋白质化学修饰的研究进展

李文静 李利君* 吴喆瑜 刘嘉男 巩建业 廖辉 刘小琴

(集美大学食品与生物工程学院, 厦门 361000)

摘要 蛋白质是生命的物质基础, 其特定的空间结构决定了蛋白质的功能。用化学修饰的方法改变蛋白质结构和功能一直是蛋白质工程改造方面研究的热点。在越来越多的研究报道中, 不仅有利用一系列酶对翻译后的蛋白质进行修饰的方法, 还有利用小分子物质缀合的修饰方法。该文在分析和总结现有相关文献的基础上, 综述了蛋白质末端修饰、侧链上的巯基修饰、二硫键修饰及磷酸化修饰的方法。

关键词 蛋白质; 化学修饰; 末端修饰; 侧链修饰

Progress on Chemical Modification of Protein

Li Wenjing, Li Lijun*, Wu Zheyu, Liu Jianan, Gong Jianye, Liao Hui, Liu Xiaoqin

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361000, China)

Abstract Protein is the basic substance of life and its specific spatial structures were very important for the function. Changing the structure and function of proteins by using chemical modification is always the focus in the study of protein engineering. In some reports, many enzymes and chemical modifiers have been used to modify and convert the characteristics of proteins. The former method altered the protein post-translated and the latter conjugated small molecules to protein. Therefore, on the basis of analyzing and summarizing the existing related literatures, we present the methods about chemical modification of protein, including terminal modification, side-chain modification about thiol, disulfide bond and phosphorylation.

Keywords protein; chemical modification; terminal modification; side-chain modification

蛋白质是一类有机大分子, 是构成细胞的基本有机物质, 是生命的物质基础, 是生命活动的主要承担者。蛋白质的生物活性是由其特定的化学结构和空间结构决定的, 空间结构的微小变化可能都会引起蛋白质生物活性的改变。化学修饰是指通过改变蛋白质的化学结构使其空间结构发生变化从而导致自身生物活性及功能的改变。蛋白质的化学修饰有两种。一种是蛋白质翻译后受到一系列修饰酶和去修饰酶的严格调控, 使得蛋白质表现出某种稳定或动态的特定功能即蛋白质的翻译后修饰(post-

translational modifications, PTMs); 另一种是通过引入或除去化学基团, 使蛋白质共价结构发生改变。

真核细胞中存在着各种各样的蛋白修饰方法, 调控着细胞不同的生理及病理过程, 因此对蛋白质的化学修饰需要更为深入的研究。自20世纪70年代以来, 关于用有机合成的方法进行蛋白质化学修饰的报道越来越多^[1-2]。此后, 对蛋白质化学修饰的方法研究更加深入, 使其能够赋予蛋白质新的特定功能并且改善某些重要功能。如在生物医学方面, 化学修饰可以改善药用蛋白质的免疫原性; 在生物技

收稿日期: 2018-04-10

接受日期: 2018-06-29

福建省科技计划项目(批准号: 2016N0021)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0592-6181487, E-mail: ljli@jmu.edu.cn

Received: April 10, 2018

Accepted: June 29, 2018

This work was supported by the Fujian Science and Technology Project (Grant No.2016N0021)

*Corresponding author. Tel: +86-592-6181487, E-mail: ljli@jmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-09-29 10:40:53

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180929.1040.004.html>

术方面,酶经过化学修饰后可以在溶剂中发挥更高效的催化作用,并表现出特异的催化性能;在食品加工方面,化学修饰可以在食品加工过程中提供食品质量和稳定的各种功能。因此,化学修饰是研究蛋白质结构与功能的重要手段,也是定向改造蛋白质性质的一种方法,在蛋白质工程中有着广泛的应用前景。

1 蛋白质末端修饰

蛋白质的合成起始于N末端,而蛋白质N末端的性质决定了蛋白质的活性和稳定性等。对于许多蛋白质来说,共翻译和翻译后修饰发生在N末端^[3],而在这些修饰中最常见的是N末端甲硫氨酸切除(N-terminal methionine excision, NME)和N末端乙酰化(N-terminal acetylation, NTA)。NME活性在所有生物体中均能观察到,真核生物中蛋白质的翻译起始氨基酸均为甲硫氨酸(Met)。然而,真核生物成熟后的蛋白质第一个Met往往会被剪切掉,其特异性取决于Met之后的第二个残基的特性。通常,如果第二个氨基酸是甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、丝氨酸(Ser)、半胱氨酸(Cys)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)或缬氨酸(Val)中的一个时,则Met被特异性甲硫氨酸氨肽酶(MetAPs)去除,释放出新的N末端^[4],可进行进一步的翻译后修饰。

N末端乙酰化修饰是乙酰转移酶(N-terminal acetyltransferase, NAT)催化乙酰辅酶A(AcCoA)的乙酰基团转移到蛋白质N末端的 α -氨基上。虽然NTA在原核生物中很少发生,但在真核生物中发现的蛋白质80%~90%是N末端乙酰化的^[5]。通常情况下,乙酰化发生在N末端自由氨基和赖氨酸(Lys)侧链氨基上。若发生NME后,新的N末端的第一个氨基酸是Ser、Ala、Met、Gly或Thr中的一个时,也会发生乙酰化修饰^[5-6]。文献报道,NTA在蛋白质转运和定位^[7-8]、蛋白质复合体形成^[9]及蛋白质降解^[10]等方面有着重要作用。另外,对于小分子肽,当其N末端被修饰时,亦可改变其生物学活性。最新研究报道,L1A(IDGLKAIWKKVADLLKNT-NH₂)^[11]是一种对革兰氏阴性菌表现出选择性抗菌活性而不溶于血的肽,当其N末端被乙酰化时,可穿透细胞膜,并且改变膜的机械性质,促进形状变化,同时在阴离子脂质囊泡中的裂解活性显著提高,从而导致细胞膜裂解。此外,研究者还发现,引起地中海贫血的原因也与

NTA有关^[12]。

N末端修饰除了PTMs的方法外,还可以通过化学手段添加修饰剂得到具有特定功能的蛋白质。如向N末端添加荧光团类缀合物可以得到用于体内成像的蛋白质^[13-14],添加药物类缀合物可以得到具有增加血液循环的聚乙二醇化蛋白及用于靶向药物递送的抗体等^[15-16]。另外,将细胞外基质蛋白固定化到聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAAm)水凝胶上已被广泛用于研究它们对细胞的生物化学和机械影响。然而,这种缀合的方法主要局限于残基选择性,例如通过赖氨酸的侧链进行连接,会形成不同取向的蛋白质,这样会干扰细胞对基质材料的黏附并影响其下游行为和功能。因此, Lee等^[16]开发了一种2-吡啶甲醛(2-pyridinecarboxaldehyde, 2PCA)功能化的PAAm水凝胶, 2PCA是一种可以用于N末端特异性蛋白质一步修饰的试剂^[17],从而可以通过N末端连接蛋白质。与常规的添加赖氨酸的缀合物相比,这种N末端修饰有利于附着的胶原蛋白形成纤维,以及细胞重塑和纤维束形成。

相对于蛋白质N末端而言,蛋白质C末端修饰的相关研究较少,目前常见的是C末端酰胺化和甲基化修饰。C末端酰胺化后因疏水性增加,结合力增强,导致多肽的生物学活性发生变化。研究发现,蛋白质C末端的羧基可发生甲基化,如磷蛋白磷酸酶2A的催化亚基的C末端发生甲基化后与调节亚基相互作用,从而调节神经可塑性^[18]。此外,已经发现了一些C末端修饰的肽被广泛用作各种蛋白水解酶的底物和抑制剂。

2 蛋白质侧链修饰

2.1 巯基修饰

生物体内,蛋白质巯基主要是指蛋白质或多肽的半胱氨酸残基上所带的巯基基团(RSH)。由于硫原子半径较大以及S-H键的解离能较低,使得半胱氨酸的巯基具有其他天然氨基酸很难进行的亲核反应和氧化还原功能,从而促使半胱氨酸具有一些独特功能,如亲核、氧化还原反应以及变构调节等。

蛋白质上的半胱氨酸(Cys)的天然丰度较低,这意味着在蛋白质上更容易选择半胱氨酸进行修饰。通过靶向天然的半胱氨酸残基,或者通过点突变技术将半胱氨酸引入蛋白质中的期望位点从而进行定点修饰。2009年, Chalker等^[19]总结了侧重于利用半

胱氨酸作为蛋白质化学修饰前体的方法。天然化学连接(native chemical ligation, NCL)是一种常见的巯基修饰方法。NCL是通过多肽片段连接合成长序列多肽及蛋白质的有效方法, 如通过采用N末端和C末端具有特定化学结构、侧链功能基团等未加保护的多肽片段为原料, 在液相合成条件下使多肽片段高选择性地相互连接并形成天然肽键, 从而得到长序列多肽及蛋白质。因此, 可利用NCL方法将硫酯与N末端半胱氨酸残基进行化学选择性缩合^[20], 使其成为具有价值的多功能工具^[21-22], 如作为有标记目的的肽或蛋白质^[23-24]等。

然而, 通过半胱氨酸残基将非蛋白质部分与蛋白质缀合具有更广泛的应用前景。在该修饰中, S-亚硝基化、Cys氧化及S-谷胱甘肽化是常见的修饰方法。目前, 在生物检测领域, 可通过使用具有溴或腈取代基的苄基化合物将腈基团引入蛋白质中以形成红外探针^[25]; 在生物医学领域, 可使用叶酸作为癌症治疗的靶向部分^[26], 带有溴代烷基的叶酸衍生物与RNA酶A中的工程半胱氨酸残基缀合, 生成的均匀复合物能够靶向癌细胞而不损失活性^[27]。另外, 由于巯基的氧化还原功能, 会生成硫氧蛋白(Trx)以及硫氧蛋白还原酶(TrxR), Trx/TrxR的水平在参与调控细胞识别、信号传导等生理过程中发挥重要作用。如在癌细胞中, Trx/TrxR的水平较高, 而高水平的Trx/TrxR可以抑制细胞凋亡, 促进细胞生长和抗化疗, 因此, 有效降低Trx/TrxR水平将可能成为治疗癌症的一种方法^[28]。

由于巯基的高度亲核性, 该位点修饰是人们最先研究的特异性修饰。而在近几年的相关应用中出现了新的修饰方法, 通过巯基的氧化还原作用与游离的半胱氨酸反应将其连接在蛋白质的侧链上, 这种方法通常比生物合成技术更容易和简单。这意味着简单的修饰依然可以有新的发展, 我们期待着该位点修饰的进一步发展。

2.2 二硫键修饰

二硫键是一种常见的修饰方式, 主要是指是两个半胱氨酸之间形成的共价键, 对于蛋白质的正确折叠、稳定性和细胞质蛋白的活性非常重要^[29-30]。二硫键要么包埋在蛋白质的折叠区域, 要么暴露在溶剂可及的表面上^[31]。溶剂可及的二硫键主要赋予蛋白质稳定性, 而位于蛋白质疏水口袋内的二硫化物主要贡献生物活性。大多数治疗相关的蛋白

质具有至少一个靠近表面的二硫键^[32], 明确地给予了蛋白质化学修饰进而改变生物活性及功能的机会。

自从Brocchini等^[33]首次进行二硫键修饰之后, 二硫化物官能化已经在位点选择性蛋白质修饰中获得了广泛的应用, 以衍生各种肽/蛋白质杂化物, 扩大了自然界中的所有组成成分。目前, 二硫键常见的修饰方法是利用还原剂修饰。还原剂修饰通常是利用还原剂打开二硫键后, 用带有生物素标记的烷基化试剂如biotin-IAM、biotin-HPDP^[34]等进行标记, 这样可获得具有标记目的的肽或蛋白质。

在PTMs中, 可以利用高效活化的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)进行定点修饰, PEG化针对蛋白质二硫键进行定点修饰的策略已成功应用于多种细胞因子、酶及抗体片段的修饰, 修饰后的蛋白质生物活性也得到较好的保持^[35], 在药物化学领域, 这种方法已经成功应用于干扰素、生长抑素、天冬酰胺酶、谷胱甘肽等蛋白质药物的定点修饰。同时, 基于蛋白质微环境和半胱氨酸修饰之间的相容性, 可以利用形成的二硫化物设计更有效的药物分子来治疗半胱氨酸的相关疾病^[36]。

此外, 可以使用双砷将具有刚性的大分子基团与蛋白质缀合。研究表明, 根据双砷官能团和马来酰亚胺部分的反应动力学的差异, 通过pH控制两个含巯基的生物大分子逐步进行位点特异性缀合^[37]。在pH6时, 马来酰亚胺与第一个巯基之间的第一步加成反应迅速完成而不影响双砷官能团。通过将pH值增加到8, 随着单砷的形成, 对甲苯亚磺酸进行原位消除, 并且在温和条件下与另一个含巯基的大分子发生加成反应。基于已建立的双砷化学, 可以通过靶向二硫化物来扩展蛋白质的修饰并扩展可用蛋白质生物混合物的库。因此, 该平台具有在生理条件下以直接方式构建确定的蛋白质-肽、蛋白质-蛋白质或蛋白质-DNA生物混合物的功能, 这对于量身定制的生物治疗剂可能具有重要意义。

除了使用含巯基的分子与未修饰的蛋白质缀合得到具有意义的缀合物之外, 还可以通过控制反应介质的pH值, 使含有二硫醇的分子以逐步的方式结合到已修饰的蛋白质中^[38]。例如绿色荧光蛋白, 对于这种已经引入了亲和标签以及发色团的蛋白质, 官能化后可促进其分离和检测, 这种多组分反应解决了如纯化和追踪化学修饰的蛋白质方面的问题。因为可以

赋予多于一个的标签或标记, 这种多模式重组方法对于制备精确的多功能杂交体具有巨大的潜力。

2.3 磷酸化修饰

蛋白质磷酸化是指蛋白质在磷酸化激酶的催化作用下把ATP或GTP的 γ 位磷酸基转移到蛋白质的特定位点氨基酸残基上的过程。磷酸化是一种非常重要且广泛存在于原核生物和真核生物中的翻译后修饰调控方式, 细胞内至少有30%的蛋白质被磷酸化修饰。

被磷酸化的蛋白质氨基酸可形成不同的化学键, 磷酸基团与相应氨基酸之间形成的化学键有着不同的热力学和动力学性质, 这些可能导致磷酸基团的动力学稳定性和转移潜能的改变。此外, 这些不同的化学性质可导致例如信号转导网络中生物学功能的改变^[39-42]。蛋白质磷酸化在许多信号转导途径中占据重要地位, 其可通过含有蛋白激酶、磷酸酶和磷蛋白感应蛋白的网络进行感测和传输信号^[43-45]。通过信号转导蛋白的级联, 磷酸盐可以在这些信号转导网络中转移, 从而整合不同的调节网络^[44,46-49]。

如细菌蛋白酪氨酸激酶家族中的BY激酶, 其活性位点位于能够结合ATP并将其 γ 磷酸酯转移到酪氨酸残基的羟基上的催化结构域上^[50]。激酶上半保守的C末端序列与几个成簇的酪氨酸代表自磷酸化位点。当激酶酪氨酸簇上的残基磷酸化时, 八聚体解离并形成允许与细胞底物相互作用和磷酸化的单体BY激酶^[51]。当脱磷酸化时, BY激酶形成八聚体, 其中一个单体的酪氨酸簇位于相邻单体的催化位点。因此, 酪氨酸簇的固有灵活性允许所有酪氨酸残基的磷酸化。此外, 对于BY激酶来说, 不同类型的激酶磷酸化后活性也不同。例如, 枯草芽孢杆菌BY激酶PtkB(EpsB)的自体磷酸化抑制激酶活性^[52], 而来自金黄色葡萄球菌的BY激酶CapB2自磷酸化后具有活性。

细菌蛋白质的网络结构除了通过酪氨酸磷酸化来调节外, 还能通过丝氨酸和精氨酸来调控^[53-54]。由于磷酸化的氨基酸残基有时因不同的机制和化学差异而具有双重作用, 使得利用酪氨酸、丝氨酸或精氨酸磷酸化的细菌蛋白质网络的性质显示出根本的差异, 然而, 最近的研究表明, 这些不同的细胞磷酸化系统似乎能够进行通信^[55-56]。这些不同的磷酸化系统因为具有独特和重叠的作用与机制, 不仅允许快速的应激反应, 而且还可以被认为是多功能的表观遗传反应系统。

2.4 其他侧链修饰

除了以上介绍的修饰方法之外, 还有甲基化、糖基化、脂基化和乙酰化等修饰方法。组蛋白精氨酸(Arg)的甲基化在基因转录调控中发挥着重要作用, 并能影响细胞的多种生理过程, 包括DNA修复、信号转导、细胞发育及癌症发生等^[57]。糖基化的铁转移蛋白是一种金属转运血清蛋白, 具有间接调节铁离子平衡的作用^[58]。近年来, 越来越多的研究表明, 脂修饰在微生物感染、信号传导、免疫调控和肿瘤发生过程中起着重要作用^[59]。同时, 非组蛋白乙酰化修饰研究也取得了一定成果, 如发现沙门氏菌中代谢酶存在可逆性乙酰化现象^[60], 揭示了蛋白质乙酰化修饰对细胞自噬调控的分子机制^[61]。

此外, 碳氢化合物修饰一直是研究人员攻克的难点方向。在最近的研究报告中, Yu等^[62]研究了一种新的修饰方法, 通过金属催化剂与肽骨架的配位促进了N末端丙氨酸残基的C-H芳基化。因为这份开创性的报道, 让C-H键的直接官能化有了根本性进展, 从而使特异性针对脂肪族残基修饰有了可行的方法^[63-67]。最新有研究报道了一种通过光敏激活三级C-H键的例子, 如亮氨酸二肽的叔C-H键被激活后直接叠氮化^[68], 这种C-H键的官能化使有机和生物分子的三级C-H键选择性标记具有不同化学和生物物理性质的标签, 为蛋白质或肽的功能研究提供了潜在的有价值的工具。因此, C-H功能化的新兴趋势将有助于为脂肪族和芳香族氨基酸开发提供新的思路。

3 前景与展望

化学修饰是一种重要的蛋白质设计手段。修饰的肽和蛋白质的生物学重要性一直以来都是探索各种化学修饰的强大动力。经过化学修饰的蛋白质不仅能维持蛋白质较高的生物活性, 而且能够有效地克服蛋白质免疫原性和毒性方面的缺点, 同时赋予蛋白质一些新的优良性能, 将其与基因工程、蛋白质工程相结合, 在生化药物研究与开发中将有更好的发展前景。虽然现在对于化学修饰的研究越来越多, 但是对修饰后的蛋白的认识还不够深入, 尤其是对大部分脂修饰的蛋白和脂肪族修饰的蛋白的结构和功能知之甚少。因此, 对修饰后的蛋白质的结构和功能还需要进一步的研究。此外, 化学修饰的方法需与时俱进, 不应局限于蛋白质的单一修饰方法,

而应结合不同修饰方法的优点, 制备更复杂的大分子结构, 如高级蛋白结合物等。蛋白质修饰的转化途径需具有革新现代有机合成的能力, 同时修饰后的蛋白也能提供高价值的生物靶标以满足紧急的社会需求。

参考文献 (References)

- 1 Kodera Y, Matsushima A, Hiroto M, Nishimura H, Ishii A, Ueno T, *et al.* Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. *Prog Polym Sci* 1998; 23(7): 1233-71.
- 2 Palaparthi R, Wang H, Gulati A. Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins. *Adv Drug Deliver Rev* 2000; 40(3): 185-98.
- 3 Varland S, Osberg C, Arnesen T. N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *Proteomics* 2015; 15(14): 2385-401.
- 4 Sherman F, Stewart JW, Tsunasawa S. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *Bioessays* 1985; 3(1): 27-31.
- 5 Polevoda B, Sherman F. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* 2003; 325(4): 595-22.
- 6 Hong H, Cai Y, Zhang S, Ding H, Wang H, Han A. Molecular basis of substrate specific acetylation by n-terminal acetyltransferase natb. *Structure* 2017; 25(4): 641-9.
- 7 Forte GM, Pool MR, Stirling CJ. N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 2011; 9(5): e1001073.
- 8 Dikiy I, Eliezer D. N-terminal acetylation stabilizes N-terminal helicity in lipid-and micelle-bound α -synuclein and increases its affinity for physiological membranes. *J Biol Chem* 2014; 289(6): 3652-65.
- 9 Scott DC, Monda JK, Bennett EJ, Harper JW, Schulman BA. N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 2011; 334(6056): 674-8.
- 10 Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* 2010; 327(5968): 973-7.
- 11 Alvares DS, Wilke N, Neto JR. Effect of N-terminal acetylation on lytic activity and lipid-packing perturbation induced in model membranes by a mastoparan-like peptide. *BBA-Biomembranes* 2018; 1860(3): 737-48.
- 12 Ashiuchi M, Yagami T, Willey RJ, Padovan JC, Chait BT, Popowicz A, *et al.* N-Terminal acetylation and protonation of individual hemoglobin subunits: position-dependent effects on tetramer strength and cooperativity. *Protein Science* 2005; 14(6): 1458-71.
- 13 Xue L, Karpenko IA, Hiblot J, Johnsson K. Imaging and manipulating proteins in live cells through covalent labeling. *Nat Chem Biol* 2015; 11(12): 917-23.
- 14 Agarwal P, Beahm BJ, Shieh P, Bertozzi CR. Systemic fluorescence imaging of zebrafish glycans with bioorthogonal chemistry. *Angew Chem Int Edit* 2015; 54(39): 11504-10.
- 15 Dozier JK, Distefano MD. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins. *Int J Mol Sci* 2015; 16(10): 25831-64.
- 16 Lee JP, Kassianidou E, MacDonald JI, Francis MB, Kumar S. N-terminal specific conjugation of extracellular matrix proteins to 2-pyridinecarboxaldehyde functionalized polyacrylamide hydrogels. *Biomaterials* 2016; 102: 268-76.
- 17 Hung KY, Harris PW, Desai A, Marshall JF, Brimble MA. Structure-activity relationship study of the tumour-targeting peptide A20FMDV2 via modification of Lys16, Leu13, and N-and/or C-terminal functionality. *Eur J Med Chem* 2017; 136: 154-64.
- 18 Marino G, Eckhard U, Overall CM. Protein termini and their modifications revealed by positional proteomics. *Acs Chem Biol* 2015; 10(8): 1754-64.
- 19 Chalker JM, Bernardes GJ, Lin YA, Davis BG. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Cheminform* 2009; 4(5): 630-40.
- 20 Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 1994; 266(5186): 776-9.
- 21 Petszulat H, Seitz O. A fluorogenic native chemical ligation for assessing the role of distance in peptide-templated peptide ligation. *Bioorgan Med Chem* 2017; 25(18): 5022-30.
- 22 Wissner RF, Batjargal S, Fadzen CM, Petersson EJ. Labeling proteins with fluorophore/thioamide Förster resonant energy transfer pairs by combining unnatural amino acid mutagenesis and native chemical ligation. *J Am Chem Soc* 2013; 135(17): 6529-40.
- 23 Kent SBH. Total chemical synthesis of proteins. *Chem Soc Rev* 2009; 38(2): 338-51.
- 24 Schardon C, Tuley A, Er J, Swartzel J, Fast W. Selective covalent protein modification by 4-halopyridines through catalysis. *Chem-biochem* 2017; 18(15): 1551-6.
- 25 Jo H, Culik RM, Korendovych IV, DeGrado WF, Gai F. Selective incorporation of nitrile-based infrared probes into proteins via cysteine alkylation. *Biochemistry* 2010; 49(49): 10354-6.
- 26 Wei X, Low PS. Folate-targeted therapies for cancer. *J Med Chem* 2010; 53(19): 6811-24.
- 27 Smith BD, Higgin JJ, Raines RT. Site-specific folate conjugation to a cytotoxic protein. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(17): 5029-32.
- 28 Pace NJ, Weerapana E. Diverse functional roles of reactive cysteines. *Acs Chem Biol* 2013; 8(2): 283-96.
- 29 Kadokura H, Beckwith J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxid Redox Sign* 2010; 13(8): 1231-46.
- 30 Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(4): 210-4.
- 31 Zloh M, Shaunak S, Balan S, Brocchini S. Identification and insertion of 3-carbon bridges in protein disulfide bonds: a computational approach. *Nat Protoc* 2007; 2(5): 1070-83.
- 32 Brocchini S, Godwin A, Balan S, Choi JW, Zloh M, Shaunak S. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Adv Drug Deliver Rev* 2008; 60(1): 3-12.
- 33 Brocchini S, Balan S, Godwin A, Choi JW, Zloh M, Shaunak S. PEGylation of native disulfide bonds in proteins. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2241-52.
- 34 Garciasantamarina S, Boronat S, Domènech A, Ayté J, Molina H, Hidalgo E. Monitoring *in vivo* reversible cysteine oxidation in proteins using ICAT and mass spectrometry. *Nat Protoc* 2014; 9(5): 1131-45.
- 35 Shaunak S, Godwin A, Choi JW, Balan S, Pedone E, Vijayaran-

- gam D, *et al.* Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins. *Nat Chem Biol* 2006; 2(6): 312-3.
- 36 Bhatnagar A, Bandyopadhyay D. Characterization of cysteine thiol modifications based on protein microenvironments and local secondary structures. *PROTEINS* 2018; 86(2): 192-209.
 - 37 Wang T, Wu Y, Kuan SL, Dumele O, Lamla M, Ng DY, *et al.* A disulfide intercalator toolbox for the site-directed modification of polypeptides. *Chem-Eur J* 2015; 21(1): 228-38.
 - 38 Wang T, Riegger A, Lamla M, Wiese S, Oeckl P, Otto M, *et al.* Water-soluble allyl sulfones for dual site-specific labelling of proteins and cyclic peptides. *Chem Sci* 2016; 7(5): 3234-9.
 - 39 Buchowiecka AK. Puzzling over protein cysteine phosphorylation—assessment of proteomic tools for S-phosphorylation profiling. *Analyst* 2014; 139(17): 4118-23.
 - 40 Song H, Feng X, Zhang M, Jin X, Xu X, Wang L, *et al.* Crosstalk between lysine methylation and phosphorylation of atg16l1 dictates the apoptosis of hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes. *Autophagy* 2018; 1: 1-20.
 - 41 Fuhrmann J, Clancy KW, Thompson PR. Chemical biology of protein arginine modifications in epigenetic regulation. *Chem Rev* 2015; 115(11): 5413-61.
 - 42 Sun F, Ding Y, Ji Q, Liang Z, Deng X, Wong CC, *et al.* Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(38): 15461-6.
 - 43 Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2002; 4(5): 127-30.
 - 44 Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *CSH Perspect Biol* 2014; 6(5): a020644.
 - 45 Kyriakis JM. In the beginning, there was protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2014; 289(14): 9460-2.
 - 46 Hunter T. Signaling—2000 and beyond. *Cell* 2000; 100(1): 113-27.
 - 47 Mitrophanov AY, Groisman EA. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Gen Dev* 2008; 22(19): 2601-11.
 - 48 Huck NV, Leissing F, Majovsky P, Buntru M, Aretz C, Flecken M, *et al.* Combined¹⁵N-labeling and tandemmoac quantifies phosphorylation of map kinase substrates downstream of mkk7 in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 2017; 8: 2050.
 - 49 He Z, Huang T, Ao K, Yan X, Huang Y. Sumoylation, phosphorylation, and acetylation fine-tune the turnover of plant immunity components mediated by ubiquitination. *Front Plant Sci* 2017; 8: 1682.
 - 50 Lee DC, Zheng J, She YM, Jia Z. Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J* 2008; 27(12): 1758-66.
 - 51 Olivaresillana V, Meyer P, Bechet E, Gueguen-Chaignon V, Soulat D, Lazereg-Riquier S, *et al.* Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol* 2012; 6(6): e143.
 - 52 Elsholz AK, Wacker SA, Losick R. Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes Dev* 2014; 28(15): 1710-20.
 - 53 Bragg J, Rajkovic A, Anderson C, Curtis R, Van Houten J, Begres B, *et al.* Identification and characterization of a putative arginine kinase homolog from *Myxococcus xanthus* required for fruiting body formation and cell differentiation. *J Bacteriol* 2012; 194(10): 2668-76.
 - 54 Kirstein J, Zühlke D, Gerth U, Turgay K, Hecker M. A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *Embo J* 2005; 24(19): 3435-45.
 - 55 Wang J, Ghosh SS, Ghosh S. Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. *Am J Physiol-Cell Ph* 2017; 312(4): C438-45.
 - 56 Jungas T, Perchey RT, Fawal M, Callot C, Froment C, Burlet-Schiltz O, *et al.* Eph-mediated tyrosine phosphorylation of citron kinase controls abscission. *J Cell Biol* 2016; 214(5): 555-69.
 - 57 Copeland RA. Protein methyltransferase inhibitors as precision cancer therapeutics: a decade of discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; 373(1748): pii: 20170080.
 - 58 van Rensburg SJ, Berman P, Potocnik F, MacGregor P, Hon D, de Villiers N. 5- and 6-glycosylation of transferrin in patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 2004; 19(1/2): 89-96.
 - 59 Hundt M, Tabata H, Jeon MS, Hayashi K, Tanaka Y, Krishna R, *et al.* Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity* 2006; 24(5): 513-22.
 - 60 Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 2012; 13(5): 343-57.
 - 61 Yi C, Ma M, Ran L, Zheng J, Tong J, Zhu J, *et al.* Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science* 2012; 336(6080): 474-7.
 - 62 Gong W, Zhang G, Liu T, Giri R, Yu JQ. Site-selective C(sp³)-H functionalization of Di-, Tri-, and tetrapeptides at the N-terminus. *J Am Chem Soc* 2014; 136(48): 16940-6.
 - 63 Noisier AF, Brimble MA. C-H functionalization in the synthesis of amino acids and peptides. *Chem Rev* 2015; 45(45): 8775-806.
 - 64 Ruan Z, Sauermann N, Manoni E, Ackermann L. Manganese-catalyzed C-H alkynylation: expedient peptide synthesis and modification. *Angew Chem* 2017; 56(129): 3172-6.
 - 65 Hansen MB, Hubálek F, Skrydstrup T, Hoeg-Jensen T. Chemo- and regioselective ethynylation of tryptophan-containing peptides and proteins. *Chemistry* 2016; 22(5): 1572-6.
 - 66 Schischko A, Ren H, Kaplaneris N, Ackermann L. Bioorthogonal diversification of peptides through selective ruthenium(II)-catalyzed C-H activation. *Angew Chem Int Edit* 2017; 56(6): 1576-80.
 - 67 Reay AJ, Williams TJ, Fairlamb IJ. Unified mild reaction conditions for C2-selective Pd-catalyzed tryptophan arylation, including tryptophan-containing peptides. *Org Biomol Chem* 2015; 13(30): 8298-309.
 - 68 Wang Y, Li GX, Yang G, He G, Chen G. A visible-light-promoted radical reaction system for azidation and halogenation of tertiary aliphatic C-H bonds. *Chem Sci* 2016; 7(4): 2679-83.