



张宏权, 北京大学教授, 博士生导师, 国家重点实验室PI, 肿瘤、细胞和衰老学科群主任, 中国抗癌协会肿瘤转移专业委员会主任委员, 主要研究兴趣是蛋白质翻译后修饰与肿瘤发生、侵袭、转移和耐药的调控机制, 已发表120余篇SCI论文。

新型蛋白质酰基化修饰与肿瘤的发生发展

李义晓^{1,2,3} 蒋珣涵^{1,2,3} 张宏权^{1,2,3*}

(¹北京大学基础医学院, 北京 100191; ²北京大学国际癌症研究院, 北京 100191;

³北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要 基因的表观调控通常由化学基团对组蛋白和非组蛋白的动态调控共同决定, 而蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)作为表观调控的主要因素, 以共价连接的方式在蛋白质特异位点添加小分子, 进而对蛋白质结构、功能、稳定性以及活性产生一定影响, 最终影响生命活动进程。而染色质中修饰语言的错误书写、拼读、删除是人类癌症中常见的、有时是早期和关键的事件, 可通过诱导表观遗传、转录组和表型改变促进肿瘤的发生。其中赖氨酸作为一种两亲性氨基酸, 具有疏水侧链, 且赖氨酸具有正电荷可以被酰基化修饰所中和, 因此赖氨酸是最常发生修饰的氨基酸。酰基化修饰不仅可以改变蛋白质的结构影响蛋白质的功能, 而且在DNA转录、损伤修复、氧化应激、细胞代谢、细胞周期、衰老、血管生成等生命活动中起着至关重要的作用。接下来该文就最近发现的新型酰基化修饰展开综述, 回顾新型酰基化修饰的发现过程、调控机制以及其在肿瘤发生发展中的重要作用。

关键词 翻译后修饰; 酰基化; 组蛋白

Newly Identified Acylation Modifications and Tumor Development

LI Yixiao^{1,2,3}, JIANG Yuhuan^{1,2,3}, ZHANG Hongquan^{1,2,3*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; ²Peking University International Cancer Institute, Beijing 100191, China; ³State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract The epigenetic regulation of genes is often jointly determined by the dynamic regulation of chemical groups on histone and non-histone proteins. PTM (post-translational modification), as the main factor of epigenetic regulation, adds small molecules at specific protein sites in the way of covalent linking. Fur-

收稿日期: 2022-02-23 接受日期: 2022-03-10

科技部重点研发专项(批准号: 2021YFC2501000)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 81730071)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 81972616、81230051、81972609、81773199)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-82802715, E-mail: Hongquan.zhang@bjmu.edu.cn

Received: February 23, 2022 Accepted: March 10, 2022

This work was supported by the Key Research and Development Project of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2021YFC2501000), the Key Project of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81730071), and the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81972616, 81230051, 81972609, 81773199)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82802715, E-mail: Hongquan.zhang@bjmu.edu.cn

thermore, it can affect the function, structure, stability and activity of proteins, and finally affect the process of life activities. Miswriting, misreading, or misdeletion of modifying language in chromatin is a common and sometimes early and critical event in human cancer, contributing to tumor development by inducing epigenetic, transcriptome, and phenotypic changes. Lysine, as an amphiphilic amino acid, has hydrophobic side chains and acylation can neutralize the positive charge of lysine, so lysine is the most frequently modified amino acid. Acylation modification can not only change protein structure but also affect protein function. Moreover, it plays a crucial role in DNA transcription, damage repair, oxidative stress, cell metabolism, cell cycle, senescence, angiogenesis and other life activities. Next, this paper reviewed the newly identified acylation modifications recently discovered, and reviewed the discovery, regulation and important role of newly identified acylation modifications in tumor progression in the past decade.

Keywords post-translational modification; acylation; histone

上世纪60年代,乙酰化(acetylation)的首次发现,开启了人们对于翻译后修饰(post-translational modification, PTM)的深入研究^[1-2]。而近十年来随着高分辨率液相串联质谱技术(high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric, HPLC-MS/MS)的应用,越来越多的新型翻译后修饰及位点得到鉴定^[3-4]。其中根据修饰基团性质的不同,新型酰基化修饰被分为三类(1) 疏水性酰基化修饰:赖氨酸丙酰化(lysine propionylation, Kpr)、赖氨酸丁酰化(lysine butyrylation, Kbu)和赖氨酸巴豆酰化(lysine crotonylation, Kcr); (2) 极性酰基化修饰:赖氨酸 β -羟基丁酰化(lysine β -hydroxybutyrylation, Kbh)和2-羟基异丁酰化(lysine 2-hydroxyisobutyrylation, Khib); (3) 酸性酰基化修饰:赖氨酸丙二酰化(lysine malonylation, Kma)、赖氨酸琥珀酰化(lysine succinylation, Ksucc)、赖氨酸戊二酰化(lysine glutarylation, Kglu)^[5], 以及近两年发现的赖氨酸乳酸化(lysine lactylation, Kla)和异烟酰化(lysine isonicotinyl-ation, Kinic)(表1)。而根据所修饰蛋白种类不同,酰基化修饰又被分为组蛋白翻译后修饰和非组蛋白翻译后修饰,其中新型酰基化修饰常发现于组蛋白上,且在结构和功能上不同于被广泛研究的组蛋白赖氨酸乙酰化(lysine acetylation, Kac)。这些新型组蛋白酰基化修饰相关的酶促反应和代谢机制,以及生理功能,涉及到基因激活、精子生成、组织损伤修复和代谢应激等重要生命过程。本文就近年来典型的新型酰基化修饰从发现、调节、及其与肿瘤关系方面作一综述。

1 疏水性酰基化修饰: Kcr

2011年美国芝加哥大学 ZHAO 课题组^[7]利用 PTmap 技术,首次在人体细胞及小鼠生殖细胞组蛋白

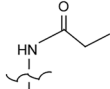
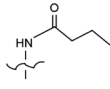
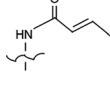
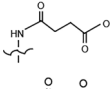
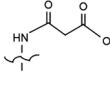
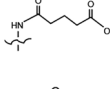
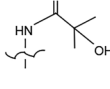
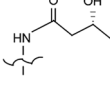
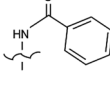
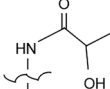
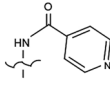
中发现了一种区别于乙酰化的新型翻译后修饰——Kcr, 同时鉴定出了67个组蛋白巴豆酰化修饰位点,并证明该修饰是激活的启动子和潜在的增强子信号的标志,且其可作为人体细胞和减数分裂后小鼠雄性生殖细胞中活跃染色体连锁基因的特异性标记;2017年 ZHANG 课题组^[15]首次提出,非组蛋白也可发生巴豆酰化修饰,同时鉴定到部分乙酰转移酶和去乙酰化酶具有巴豆酰转移酶和去巴豆酰化酶活性。Kcr 是一种进化上具有高度保守性的新型翻译后修饰,研究人员通过对斑马鱼幼虫进行全蛋白质谱分析,鉴定到218个非组蛋白上的557个巴豆酰化修饰位点,同时发现该修饰可以调节肌肉收缩和蛋白质合成,进一步为研究 Kcr 与衰老和心力衰竭的关系奠定了研究基础^[16]。

巴豆酰化修饰不同于其他酰基化修饰,其具有独特的 C-C- π 平面结构,具有极强的刚性特征。因此巴豆酰化在特点上与乙酰化既相似又不同,相似之处在于(1) 两者修饰位点都集中在 N-端赖氨酸, (2) 两者共用一套转移酶系统, (3) 两种基团均由 ϵ -胺键(epsilon amine groups) 连接; 不同在于(1) 烃链长度, (2) 电荷, (3) 疏水性^[17]。研究发现,与乙酰化相比,巴豆酰化的转录激活能力更强。定量蛋白组学结果也显示,巴豆酰化修饰所靶向的位点只有43%与乙酰化重叠,提示这两种修饰所作用的底物蛋白存在差异^[17]。

1.1 组蛋白巴豆酰转移酶(histone crotonyltransferases, HCTs)

赖氨酸酰基化主要由“书写器”和“擦除器”之间酶活性的动态平衡所调节,也有人提出非酶促反应也会促进赖氨酸酰基化,尤其是在线粒体内,因其内具有相对较高的 pH 值和酰基辅酶 A 浓度,有利于赖氨酸发生酰基化,而核内条件则相对不利于非酶促

表1 新型酰基化修饰列表
Table1 List of novel acylation modifications

修饰 Modification	年份 Year	书写器蛋白 Writers	擦除器蛋白 Erasers	阅读器蛋白 Readers	结构式 Structure	参考文献 References
Propionylation	2007	CBP/p300, PCAF, GCN5, MOF, HBO1, MOZ	SIRT1, SIRT2, SIRT3	BRPF1		[6]
Butyrylation	2007	CBP/p300, PCAF, GCN5	SIRT1, SIRT2, SIRT3	BRPF1		[6]
Crotonylation	2011	CBP/p300, MOF, PCAF	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, SIRT1, SIRT2, SIRT3	Taf14, AF9, DPF2		[7]
Succinylation	2012	GCN5, HAT1	SIRT5, SIRT7	GAS41		[8]
Malonylation	2012	—	SIRT5	—		[8]
Glutarylation	2014	p300	SIRT5	—		[9]
2-hydroxyisobutyrylation	2014	p300, Tip60	HDAC1, HDAC2, HDAC3, SIRT3	—		[10]
β-hydroxybutyrylation	2016	p300	—	—		[11]
Benzoylation	2018	—	SIRT2	YEATS2, DPF2		[12]
Lactylation	2019	p300	HDAC1, HDAC2, HDAC3	—		[13]
Isonicotinylation	2021	CBP/p300	HDAC3	—		[14]

年份: 修饰首次被报道年份。—: 目前还未被报道。
Year: the year when modification was first reported. —: it has not yet been reported.

反应的发生^[18]。
目前为止, 大多数被鉴定到的组蛋白酰基化修饰都与乙酰化共用一套转移酶系统, 其中“书写器”组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases, HATs)根据其序列和结构特征被分为3个家族: (1) Gcn5相关的N-乙酰转移酶家族(Gcn5-related N-acetyltransferase, GNAT); (2) MYST(Moz, Ybf2, Sas2 and Tip60)家族; (3) CREB/p300结合蛋白(CBP/p300)家

族。这些转移酶已被证实能够将不同的酰基基团加到特定的组蛋白赖氨酸位点^[19]。
其中p300首先被发现在体内和体外均具有HCT的功能, 且相比于催化Kac, 该酶对Kcr具有更强催化能力^[20]。在体内, p300催化两种修饰的程度取决于巴豆酰辅酶A(crotonyl-CoA)和乙酰辅酶A(acetyl-CoA)的相对浓度^[21]。此外, 人源MOF能够催化组蛋白H3K18、H3K23、H4K8和H4K12位点发生Kcr^[22]。

PCAF同样被报道具有HCT活性,如催化NPM1等非组蛋白发生巴豆酰化修饰^[15]。近来WENG研究组^[23]发现,HBO1可以和JADE以及BRPF家族蛋白2形成三聚体复合物,在体内外催化多种组蛋白酰基化修饰,如乙酰化、丙酰化、巴豆酰化,其中H4K14cr与DNA复制起始位点的选择密切相关。

1.2 组蛋白去巴豆酰化酶(histone decrotonylases, HDACs)

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)主要包括2个家族。(1) Zn^{+} 依赖的组蛋白去乙酰化酶家族,包括I类HDACs(HDAC1~3, HDAC8),定位于细胞核;II类HDACs(HDAC4~7, HDAC9~10)和IV类HDAC(HDAC11),定位于细胞核和细胞质。(2) NAD^{+} 依赖的去乙酰化酶家族,包括III类HDAC(Sirtuin1~7)。

研究发现,I类HDAC家族中的HDAC1~3和III类HDAC家族中的SIRT1~3起到最主要的去巴豆酰化酶的作用^[24]。其中HDAC3最早被报道在体外具有HDCR活性,在体外实验中,HDAC3可以和Ncor1形成二元复合物,降低组蛋白巴豆酰化水平^[25]。而随后研究发现,HDAC1、HDAC2、HDAC8在体外同样均具有HDCR活性,其中HDAC1、HDAC2可以去除H3K18cr。体外亲和层析实验显示,SIRT1~3可以识别H3K4cr,其中SIRT3和巴豆酰基团亲和度最高^[26]。在胚胎干细胞的研究中发现,HDAC1/CoREST1/LSD1可以形成三元复合物,降低组蛋白H3K18ac和H3K18cr水平,HDAC1/2的基因缺失提高了组蛋白巴豆酰化的整体水平,导致去巴豆酰化酶活性整体下降85%^[27]。最近研究也发现,SIRT7可以去除非组蛋白PHF5A的K25位点巴豆酰化,促进成纤维细胞的衰老^[28]。

1.3 巴豆酰化阅读器蛋白(crotonylation reader)

组蛋白的阅读器蛋白主要包括3个家族:(1) Bromo结构域蛋白家族;(2) YEATS(Yaf9, ENL, AF9, Taf14, and Sas5)结构域蛋白家族;(3) 双植物同源结构域指状蛋白家族(double PHD)。3个蛋白家族分别通过不同的结构机制与赖氨酸酰基基团结合,这种结合比与未修饰的赖氨酸结合更紧密。

YEATS结构域蛋白是首个被鉴定的可识别巴豆酰化修饰的阅读器蛋白家族,其中Taf14与组蛋白上的巴豆酰基以一种独特的“ π - π - π ”叠片机制相互作用,读取组蛋白H3K9cr,参与到巴豆酰化修饰所涉及的转录调节中。另外,巴豆酰化修饰还可被

其他YEATS家族蛋白(如YEATS2、AF9)识别,其中AF9中的芳香环和巴豆酰基之间产生“ π -芳香”疏水结构,形成具有巴豆酰特异性的扩展芳香三明治口袋,与H3K9、K18、K27产生共定位,且对巴豆酰基产生高于乙酰基的亲合力^[29]。敲除AF9显著降低了赖氨酸巴豆酰化程度,但没有完全消除它,这表明对以上位点修饰的识别可能涉及其他reader蛋白或Kcr具有独立于reader的顺式效应^[29]。YEATS2蛋白可有效阅读H3K27cr,对于Kcr介导的活性转录是必不可缺少的^[30]。除此之外,MYST家族成员单核细胞白血病锌指蛋白(MOZ,也称为KAT6A)和DPF2(又叫BAF45D)的DPF结构域也表现出不同的阅读器活性。利用ChIP-qPCR和免疫荧光分析发现,MOZ在细胞中以依赖于DPF结构域的方式与H3K14cr的位点共定位,且优先结合巴豆酰化而非乙酰化,DPF结构域蛋白能够和组蛋白N-端的Kcr相互作用,识别H3K4cr等修饰^[31]。

1.4 巴豆酰辅酶A(crotonyl-CoA)

非乙酰-酰基辅酶A往往从短链脂肪酸代谢中产生,可作为酰基基团的供体,增加组蛋白及非组蛋白酰基化修饰。如图1所示,体内巴豆酰辅酶A主要由三条途径产生:(1) 外源补充巴豆酸,后者在肠道中由肠道菌群代谢,成为巴豆酰辅酶A的前体物质^[32];(2) 乙酸、巴豆酸、丁酸、丙酸等循环短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)被组织吸收后,由酰基辅酶A合成酶短链家族成员2(acetyl-coA synthetase 2, ACSS2)转化为巴豆酰辅酶A^[33];(3) 酰基辅酶A脱氢酶A通过脂肪酸 β 氧化和赖氨酸降解等不同代谢途径将SCFA转化为巴豆酰辅酶A^[34]。除了酰基辅酶A本身因素外,也有其他因素通过影响酰基辅酶A进而影响修饰水平。研究发现参与乙酰辅酶A合成的代谢酶,如ATP柠檬酸裂解酶(ATP-citratelase, ACLY)、肉碱乙酰转移酶(carnitine acetyltransferase, CAT)和乙酰辅酶A合成酶的耗竭,不但能够降低乙酰化水平,而且可以增加巴豆酰化整体水平^[35]。染色体域Y型蛋白(Chromodomain Y-like, CDYL)具有辅酶A水合酶的活性,能够将巴豆酰辅酶A转化为 β -羟基丁酰辅酶A,下调组蛋白巴豆酰化水平^[36]。CDYL也可以下调非组蛋白RPA1的巴豆酰化,破坏它与单链DNA的相互作用,影响DNA损伤修复^[37]。此外,在戊二酰辅酶A脱氢酶的催化下,线粒体内必需氨基酸赖氨酸或色氨酸的降

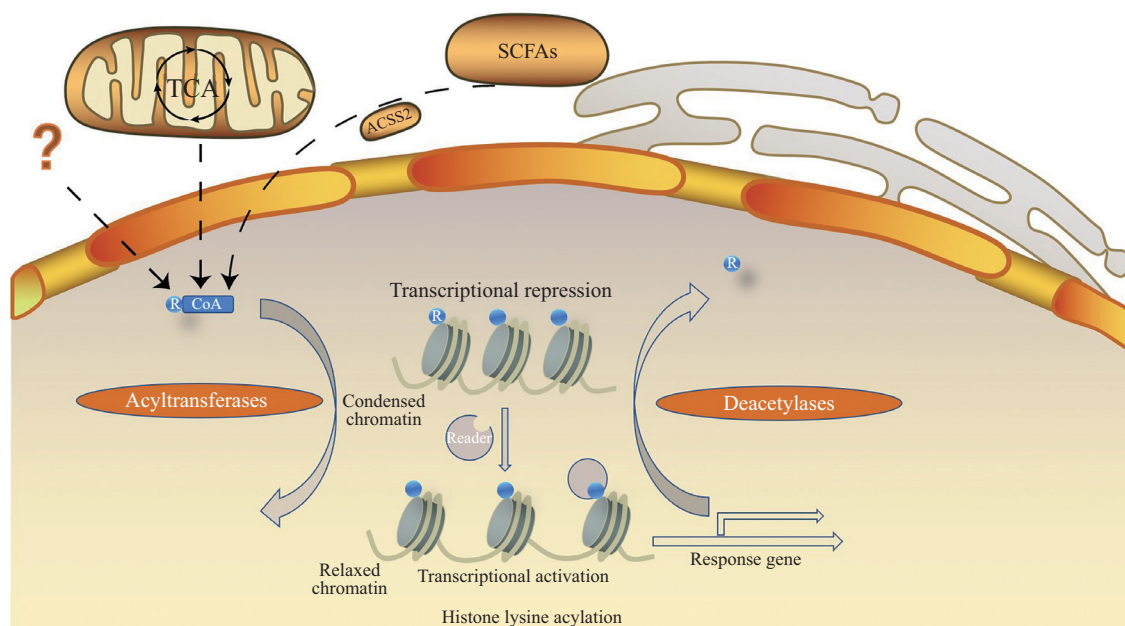
解也会在戊二酰辅酶A氧化脱羧的基础上产生巴豆酰辅酶A中间体。无论是通过脂肪酸 β -氧化途径还是氨基酸降解途径产生的巴豆酰辅酶A, 都会在烯醇辅酶A水合酶的催化作用下生成3-羟基丁酰辅酶A。同时也有一些巴豆酰辅酶A会逃避降解, 从线粒体流出, 进入细胞核促进组蛋白巴豆酰化, 这与酵母中脂肪酸 β -氧化途径介导组蛋白丁酰化的证据是一致的^[38]。ECHS1水合酶也可以通过调控内源性巴豆酰辅酶A的水平, 维持心肌细胞组蛋白巴豆酰化修饰水平, 进而维持心脏稳态^[39]。

1.5 巴豆酰化与肿瘤

巴豆酰化修饰与肿瘤发生密切相关, 肿瘤相关数据库显示4.5%的肿瘤标志物蛋白具有巴豆酰化修饰, 其中32个具有巴豆酰化修饰的蛋白与肿瘤发生直接相关^[17]。肿瘤基因数据库中体细胞突变目录显示, 5.9%的基因能够发生p300介导的巴豆酰化修饰。对癌组织和癌旁组织进行免疫组化分析发现, 巴豆

酰化修饰在细胞核和细胞质中均有表达, 在肝癌、胃癌和肾癌中下调, 而在甲状腺癌、食道癌、结肠癌、胰腺癌和肺癌中上调^[40]。

肠道上皮组织, 尤其是小肠隐窝和结肠中, H3K-18cr有着极高丰度, 通过丁酸钠抑制HDAC1~3可以提高Kcr水平; 肠道微生物群减少, 亦可以通过降低短链脂肪酸产生, 降低肠道巴豆酰化整体水平^[41]。LU研究组^[42]发现, 巴豆酸可以引起p53蛋白K46位点发生巴豆酰化, 进而导致细胞内抑癌蛋白p53水平降低, 由于巴豆酸可来源于肠道菌群分解产物, 因此提示巴豆酰化修饰与早期结直肠癌发展有关。在结直肠癌细胞HCT116中敲低p300后, 鉴定到定位于69个蛋白的88个Kcr下调位点, 17个蛋白的31个Kcr上调位点, 这些位点在无义介导的衰变、真核翻译终止和真核翻译延伸过程中起着重要作用^[17]。与癌旁组织相比, 结直肠癌细胞中 α -烯醇化酶1(α -enolase 1, ENO1)的K420位点巴豆酰化水平显著升高, 促进了结直肠癌细胞的增



不同酰基辅酶A可产生于不同途径, 如琥珀酰辅酶A、乙酰辅酶A可产生于三羧酸循环; 丙酰、丁酰、巴豆酰辅酶A可由短链脂肪酸(SCFAs)经酰基辅酶A合成酶短链家族成员2(ACSS2)蛋白间接合成; 乳酰辅酶A来源于细胞质中糖酵解产物乳酸, 而异烟酰辅酶A内源性来源未知。细胞核中, 辅酶A携带酰基基团, 在酰基转移酶作用下, 将不同的酰基基团添加到组蛋白上, 可增加染色质开放性, 提高阅读器蛋白的结合, 促进下游相应基因的转录; 在去酰基化酶的作用下, 降低染色质开放性, 抑制下游相应基因转录。其中R代表不同的酰基基团。

Acyl-CoA can be produced by different pathways, such as succinyl-CoA and acetyl-CoA can be produced in the tricarboxylic acid cycle; propionyl, butyryl, and crotonyl-CoA can be produced by SCFAs (short-chain fatty acids) via ACS2 (acyl-CoA synthase chain family member 2); lactoyl-CoA is derived from the cytoplasmic glycolysis product lactate, while the endogenous source of isonicotinyl-CoA is unknown. Acyl-CoA provides an acyl group, which binds to histones by acyltransferase to increase chromatin accessibility, thereby increasing the binding of reader proteins and promoting the transcription of downstream corresponding genes. On the contrary, it reduces the accessibility of chromatin and inhibits the transcription of the corresponding downstream genes through deacetylase. R represents a different acyl group.

图1 组蛋白酰基化修饰调节模式图

Fig.1 The diagram of histone acylation regulatory pattern

殖、迁移和侵袭,其中CBP作为ENO1的巴豆酰转移酶,SIRT2作为ENO1的去巴豆酰化酶^[43]。

肺癌(lung cancer, LC)细胞A549经HDAC家族抑制剂亚甲基苯胺羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)处理后,2 445个蛋白的10 163个赖氨酸位点可以发生巴豆酰化修饰,这些蛋白主要富集在核糖体和各种代谢通路中^[44]。肺腺癌细胞H1299蛋白组学分析鉴定到1 024个蛋白上的2 696个巴豆酰化位点^[15]。

HPV相关的肿瘤中,p300通过催化异质性细胞核核糖体蛋白A1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, HnRNPA1)发生巴豆酰化修饰,增加该蛋白的表达量,从而促进HeLa、Caski、SiHa等肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移^[45]。而HeLa细胞蛋白组学显示,3 734个蛋白的14 311个位点可以发生巴豆酰化修饰,并提示Kcr在调节DNA修复中具有潜在功能^[37]。

前列腺癌(prostatic carcinoma, PCa)组织中的巴豆酰化修饰水平高于癌旁组织,且随着腺癌恶性程度增高,修饰水平逐渐上升。I-BET762、I-BET726和CPI-203等抑制剂可通过抑制Bromo结构域阅读器蛋白,抑制PC-3、LNCaP、C42B等前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[46]。

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中,赖氨酸巴豆酰化水平与肿瘤淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)和分期相关。敲除HDACs或添加HDACs抑制剂TSA可提高肝癌细胞巴豆酰化整体水平,抑制肝癌细胞的运动和增殖^[47]。

通过抑制HDAC家族降低巴豆酰化修饰水平,已经成为临床上治疗肿瘤的一种思路。目前已筛选出数十种抑制剂,其中四种(voinostat、romidessin、panabinstat和belinostat)被批准用于外周T细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤的治疗^[48]。HDAC IIa和HDAC IIb被批准用于治疗难治性皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T-cell lymphoma, CTCL); SAHA对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、乳腺癌(breast cancer)等肿瘤的治疗效果已得到证实^[49]。此外,一系列巴豆酰化阅读器蛋白特异性抑制剂也在临床上得到应用,例如:XL-13m是ENL YEATS的选择性抑制剂,当XL-13m与内源性ENL结合时,可干扰ENL在染色质上的募集,协同下调混合系列白血病(mixed lineage leukemia, MLL)的致癌基因表达,参与急性白血病的治疗过程^[50]。

2 疏水性酰基化修饰: Kpr和Kbu

2007年,通过蛋白组学、HPLC-MS/MS、蛋白质序列数据库检索、人工验证等方法,ZHAO研究组^[6]发现细胞内的两种组蛋白新型翻译后修饰——Kpr和Kbu,其中丙酰化主要发生在组蛋白H4K5、K8、K12位点,丁酰化主要发生在H4K5、K12位点,同时检测到非组蛋白p53在体外也可以发生这两种修饰。而后基于蛋白组学,TAN研究组^[51]在大肠杆菌中发现603个蛋白的1 467个丙酰化修饰位点,同时发现在高糖情况下,底物赖氨酸的丙酰化水平明显降低,提示该修饰具有保守性且在细菌碳水化合物代谢过程中发挥着独特的功能。

2.1 组蛋白丙酰转移酶(histone propionyltransferases, HPTs)和组蛋白丁酰转移酶(histone butyryltransferases, HBTs)

乙酰转移酶CBP和p300首先被发现可以催化核心组蛋白发生Kpr和Kbu,同时其自身也能发生这两种修饰,其中p300存在21个赖氨酸丙酰化位点和11个赖氨酸丁酰化位点,CBP存在12个赖氨酸丙酰化位点和7个赖氨酸丁酰化位点,这提示除了组蛋白外,非组蛋白也可以发生这两种修饰^[6]。随后研究鉴定到非组蛋白p53中1个丙酰化位点和3个丁酰化位点^[52]。N末端乙酰转移酶(N-terminal acetyltransferase, NAT) NatA在体内外均能够对组蛋白N-端进行丙酰化修饰^[53],这也是第一个被鉴定到的具有催化丙酰化修饰的N末端乙酰转移酶。GNAT乙酰转移酶家族蛋白GCN5(也称为KAT2A)和CBP/p300相关因子PCAF,以及酵母MYST乙酰转移酶家族蛋白Esa1(哺乳动物中的KAT5)也陆续被发现在体外具有催化丙酰化修饰的能力,尽管与催化乙酰化能力相比较弱。同时GCN5和PCAF也均能催化Kbu,但其催化效率低于Kpr^[5]。MYST家族的赖氨酸乙酰转移酶(lysine acetyltransferases, KATs) MOF、MOZ和HBO1在体内外作为丙酰转移酶的活性与乙酰转移酶活性一样强。HBO1也以JADE和BRPF家族支架蛋白依赖的方式催化H3K14位点发生丙酰化和丁酰化修饰^[23]。

2.2 组蛋白去丙酰化酶(histone depropionylases, HDPRs)和组蛋白去丁酰化酶(histone debutyrylases, HDBRs)

SIRT1作为第一个被鉴定到的去丙酰化酶,在细胞内能够降低p53丙酰化水平^[52]。随后研究发现,

酵母中SIRT1同源蛋白SIR2、SIRT2和SIRT3在非组蛋白底物(包括CBP和p300)上均表现出强大的去丙酰基酶活性^[54]。

2.3 丙酰化和丁酰化阅读器蛋白(propionylation and butyrylation reader)

Kpr和Kbu是两种高度动态的、优先富集于活性基因启动子区域的修饰,并可被酰化状态特异性阅读蛋白,如Bromo结构域含指蛋白1(bromodomain and PHD finger containing 1, BRPF1)识别^[55]。这是目前发现的唯一能够识别以上两种修饰的“reader”蛋白。

2.4 丙酰辅酶A(propionyl-CoA)与丁酰辅酶A(butyryl-CoA)

对小鼠进行禁食处理,其肝脏中丙酰辅酶A和丁酰辅酶A的水平与乙酰辅酶A相比降低50%到75%^[56]。丙酰辅酶A与乙酰辅酶A类似,是脂肪酸代谢的高能量产物。组蛋白中除H4K31、K44外,能够发生丙酰化和丁酰化修饰的位点也同样可以被乙酰化修饰。与乙酰化类似,丙酰化和丁酰化能够通过非酶促的方式发生,因此乙酰辅酶A、丙酰辅酶A和丁酰辅酶A的相对浓度将决定细胞内蛋白的修饰水平,而且有研究发现丙酰辅酶A在体外转录系统中能够调节基因转录^[57]。

2.5 丙酰化、丁酰化与肿瘤

质谱检测发现,白血病细胞U93内H3K23pr相比其他白血病细胞(如HL-60或THP-1)或急性非淋巴细胞白血病细胞(IMR-90)高6倍,但在单核细胞分化过程中显著降低,提示丙酰化在非实体肿瘤的发展过程中是一个动态调控的过程^[54]。

通过定量蛋白组学分析发现,在神经母细胞瘤中SAHA可以诱导28个组蛋白赖氨酸乙酰化标记和18个组蛋白赖氨酸丁酰化标记,而组蛋白上发生的这两种修饰可以响应SAHA进而用来治疗神经母细胞瘤^[58]。

70%的多形性胶质细胞瘤中存在IDH突变,靶向蛋白组学分析表明IDH突变细胞内丁酰化水平显著降低,与基因整体的转录抑制状态相一致^[59]。

在结肠癌(colon cancer)中,丙酸可以增加整体Kac和Kpr,通过抑制KATs进而抑制组蛋白丙酰化修饰,可以降低MHC相关蛋白A/B(MHC class I polypeptide-related sequence A and B, MICA/B)表达水平。这提示丙酸诱导的组蛋白丙酰化可增加MICA/B表达水平,具有激活免疫功能进而提高抗肿瘤治疗效

果的潜力^[60]。

使用急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)细胞模型和B-前体细胞ALL(B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia, B-ALL)细胞模型发现,在H4K5上的非乙酰化(丁酰化或巴豆酰化)与乙酰化的比例增加,减弱了含溴结构域蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)与染色质的相互作用,提高了BRD4核迁移率和结合活性基因转录起始位点的能力,因此代谢驱动的组蛋白乙酰化与非乙酰化修饰的比例可能是调节溴域因子与基因组结合的机制^[61]。

3 酸性酰基化修饰: Ksucc

通过SILAC、质谱和HPLC共洗脱等方法,ZHAO研究组^[62]发现琥珀酰化是一种进化上高度保守的,对不同的生理条件具有不同反应的新型酰基化修饰,琥珀酰辅酶A是赖氨酸琥珀酰化的辅助因子。同时在HeLa、小鼠胚胎成纤维细胞MEF、果蝇S2和酿酒酵母细胞中分别鉴定到了13、7、10和7个组蛋白赖氨酸琥珀酰化位点^[8]。

3.1 组蛋白琥珀酰转移酶(histone succinyltransferases, HSTs)

α 酮戊二酸脱氢酶(alpha-ketoglutarate dehydrogenase, α -KGDH)复合物定位于细胞核中,可催化 α -酮戊二酸酯(alpha-ketoglutarate, α -KG)转化为琥珀酰辅酶A,进而与基因启动子区域的GCN5结合,使H3K79位点发生琥珀酰化修饰,这在基因转录起始位点附近发生频率最高。抑制 α -KGDH复合物的形成或降低GCN5的表达,能显著降低琥珀酰辅酶A的水平,抑制基因表达,进而抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤生长^[63]。干扰GCN5可以导致乙肝病毒感染的HepaRG细胞上清液中HBV DNA、HBsAg和HBeAg水平降低,HBV感染的人肝嵌合小鼠肝脏中组蛋白H3K79succ水平显著升高,这提示GCN5介导的组蛋白H3K79succ参与了cccDNA微染色体的表观遗传调控^[64]。

通过基于SILAC的定量琥珀酰化蛋白组学分析发现,在293T细胞中肉碱棕榈酰转移酶1A(carnitine palmitoyl-transferase 1A, CPT1A)催化101个蛋白的171个赖氨酸位点发生琥珀酰化,约50%的蛋白是胞质蛋白。ENO1含有可以被CPT1A催化的位点最多,而且被琥珀酰化后的ENO1活性降低^[65]。

琥珀酰化修饰亦能通过无酶催化反应发生,且线粒体pH值可影响非酶促琥珀酰化反应。数据表明,线粒体中的蛋白质酰基化可能是由碱性pH和线粒体基质中高浓度的活性酰基辅酶A共同促进的化学反应事件^[66]。

组蛋白乙酰转移酶1(histone acetyltransferase 1, HAT1)在肿瘤发生过程中也具有组蛋白和非组蛋白的琥珀酰转移酶的功能。HAT1可以催化H3K-122succ,进而影响癌细胞的表观遗传调控并促进基因表达。HAT1也可以催化PGAM1的K99succ,导致其酶活性增加,从而提高癌细胞中糖酵解通量。临床上,HAT1在肝癌、胰腺癌、胆管癌组织中明显升高。因此,HAT1的琥珀酰转移酶活性和PGAM1蛋白的琥珀酰化可在体内外肿瘤进展中发挥重要作用^[67]。

3.2 组蛋白去琥珀酰化酶(histone desuccinylases, HDSCs)

SIRT5能高效地使蛋白质赖氨酸去琥珀酰化^[68],特别是对线粒体中的代谢中间产物。在细胞的氧化应激中,SIRT5失活能抑制IDH2和G6PD的活性,减少NADPH的产生量,降低GSH水平,减弱细胞清除ROS的能力,进而增加细胞对氧化应激的敏感性^[69]。在LPS刺激的巨噬细胞中,*IL-1 β* 基因的启动子处可以形成一个PKM2-HIF1复合物,而SIRT5缺乏的小鼠更容易发生葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎,SIRT5通过影响PKM2的琥珀酰化水平、活性和功能,一定程度上抑制巨噬细胞的促炎反应^[70]。SIRT5也催化p53蛋白的K120位点去琥珀酰化,而该位点的琥珀酰化可影响p53下游蛋白水平和细胞凋亡^[71]。

LI等^[72]发现在DNA损伤反应的启动阶段,SIRT7以依赖聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(poly-ADP-ribosylation polymerase 1, PARP1)的方式催化H3K122去琥珀酰化,H3K122的去琥珀酰化能够增强H3与DNA的结合,促进染色质凝聚和DNA损伤修复。SIRT7和PARP1都需要NAD⁺作为辅酶,PARP1的激活可通过消耗NAD⁺进而抑制SIRT7去琥珀酰化酶活性,但这一假设仍有待证实。

3.3 琥珀酰化阅读器蛋白(succinylation reader)

GAS41是组蛋白Ksucc的一个阅读器蛋白,GAS41的YEATS结构域对H3K122succ具有显著的结合亲和力,研究表明GAS41与H3K122succ在组蛋白上有显著的相互作用,并在p21启动子区域共定位^[73]。

3.4 琥珀酰辅酶A(succinyl-CoA)

琥珀酰辅酶A(succinyl-CoA)是三羧酸循环中的代谢中间产物,也是卟啉合成的前体物质,因此琥珀酰辅酶A可由三羧酸循环中产生(图1)。单链脂肪酸和某些氨基酸(如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等支链氨基酸)可分解产生丙酰辅酶A,丙酰辅酶A先羧化为甲基丙二酰辅酶A,再转化为琥珀酰辅酶A^[74]。

α -酮戊二酸脱氢酶复合物(α -KGDHC)可以作为一种反式琥珀酰化酶,以 α -酮戊二酸酯依赖的方式介导琥珀酰化, α -KGDHC的抑制降低了神经元细胞中胞质蛋白和线粒体蛋白的琥珀酰化水平。纯化后的 α -KGDHC可使多种蛋白(包括三羧酸循环中的其他酶)发生琥珀酰化,导致这些酶活性改变, α -KGDHC比琥珀酰辅酶A具有更强的琥珀酰化催化效应,说明反式琥珀酰转移酶的催化作用同样很重要^[75]。对小鼠组织中酰基辅酶A进行代谢组学分析,发现不同组织中酰基辅酶A谱存在差异,而琥珀酰辅酶A是心脏中含量最多的酰基辅酶A^[76]。

3.5 琥珀酰化与肿瘤

Cu/Zn超氧化物歧化酶(superoxide dismutase 1, SOD1)是一种重要的抗氧化酶。缺乏SOD1与包括癌症在内的多种疾病有关。SOD1琥珀酰化位点突变能抑制肺癌细胞的生长。但当SIRT5和SOD1共表达时,SOD1介导的ROS还原效应增强^[77]。

对人结直肠癌HCT116细胞进行二氯乙酸盐(dichloroacetate, DCA)处理,随后结合SILAC、抗体亲和富集和高分辨率LC-MS/MS分析,发现671个琥珀酰化位点中有179个位点Ksucc程度上调,114个位点Ksucc程度下调^[78]。SIRT5与柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)相互作用,将CS的K393和K395位点去琥珀酰化。而CS在K393和K395处的高琥珀酰化显著降低其酶活性,抑制结肠癌细胞的增殖和迁移。这些结果为结肠癌的潜在治疗方法提供了实验证据^[79]。

在肝癌细胞中,SIRT5的缺失增加了细胞内H₂O₂的产生量和氧化性DNA损伤的可能性,这可以通过敲低酰基辅酶A氧化酶1(acyl-coenzyme A oxidase 1, ACOX1)来缓解,因此SIRT5在抑制过氧化物酶体诱导的氧化应激、保护肝脏和抑制肝癌发展方面具有重要作用^[80]。

与癌旁组织相比,乳腺癌组织中大多数蛋白的Ksucc水平显著较高。生物信息学分析表明,高乙酰化或高琥珀酰化均显著富集于组蛋白中,H2A复合

物X(H2A.X)和核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM1)可能是其中的关键分子^[81]。在乳腺癌细胞和小鼠模型中敲低SIRT5会导致IDH2和其他代谢酶的琥珀酰化水平增加, 增强氧化应激, 抑制肿瘤发生, 提示SIRT5可作为乳腺癌潜在的治疗靶点^[82]。

肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)中, 102个蛋白上的135个位点的琥珀酰化在ccRCC和癌旁组织中有差异。琥珀酸脱氢酶复合体亚基A(succinate dehydrogenase subunit A, SDHA)参与三羧酸循环和氧化磷酸化, 在ccRCC中SDHAK547发生去琥珀酰化。SDHA通过K547R突变模拟去琥珀酰化, 抑制其与琥珀酸脱氢酶5(succinate dehydrogenase 5, SDH5)结合, 降低SDHA活性, 进一步促进了ccRCC细胞的增殖。在ccRCC组织中SIRT5表达也上调, 而其沉默抑制了ccRCC细胞的增殖, 说明SIRT5通过抑制SDHA的琥珀酰化促进ccRCC的肿瘤发生, 这扩展了我们对ccRCC肿瘤发生机制的理解, 提示靶向琥珀酰化是ccRCC治疗的新思路^[83]。

胃癌(gastric cancer, GC)是一种发生在胃黏膜上的恶性肿瘤, 易发生远端转移, 涉及多种复杂分子机制。S100是一个钙结合的细胞质蛋白家族, 具有广泛的功能, 在肿瘤细胞迁移和侵袭中发挥关键作用。其中S100A10在GC中高表达, S100A10的K47succ通过抑制泛素化和伴随的蛋白酶体降解得到稳定, 而CPT1A是与S100A10相互作用的赖氨酸琥珀酰转移酶。S100A10的琥珀酰化受CPT1A调控, 而去琥珀酰化受SIRT5调控。S100A10的琥珀酰化模拟突变体K47E过表达增加了细胞的侵袭和迁移^[84]。除此之外, CPT1A可对LDHA的K222进行琥珀酰化修饰, 抑制LDHA的降解, 并促进GC的侵袭和增殖, 揭示LDHA在GC中上调的可能机制^[85]。

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)中, GCN5调控YWHAZ基因(主要编码14-3-3蛋白)启动子区域H3K79succ, 调高YWHAZ mRNA水平从而促进14-3-3蛋白表达, 防止 β -catenin降解, 琥珀酰转移酶活性缺陷的GCN5 Y645A突变体降低了H3K79的琥珀酰化和14-3-3的表达水平, 导致 β -catenin稳定性降低, 从而降低了cyclin D1、c-Myc、GLUT1和LDHA水平。GCN5介导的14-3-3蛋白和 β -catenin表达可促进PDAC细胞的糖酵解、增殖、迁移和侵袭^[86]。

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell car-

cinoma, ESCC)是一种具有高侵袭性的恶性肿瘤。利用定量蛋白组学分析, 发现ESCC细胞中存在异常的蛋白质翻译后修饰, 如明显下调的赖氨酸琥珀酰化。若琥珀酰化水平恢复, 则ESCC细胞迁移被抑制。同时琥珀酰化对组蛋白甲基化促进ESCC细胞迁移起到负向调节作用^[87]。

4 极性酰基化修饰: Khib

2014年, ZHAO课题组^[88]在人和小鼠组蛋白上发现63个组蛋白2-羟基异丁酰化修饰位点, 其中27个区别于乙酰化修饰及巴豆酰化修饰。CHIP-seq证明, H4K8hib与雄性生殖细胞减数分裂和减数分裂后细胞中的活性基因转录密切相关^[10]。随后在对SAHA处理后的A549细胞进行的研究中, 鉴定到组蛋白及非组蛋白共2 484个蛋白上的8 765个赖氨酸2-羟基异丁酰化酶位点, 进而发现Khib参与核糖体、糖酵解/糖异生、基因转录等多种生物学过程^[88]。

4.1 组蛋白2-羟基异丁酰化转移酶(histone hydroxyisobutyryltransferases, HHITs)

2-羟基异丁酰化主要来源于2-羟基异丁酸和2-羟基异丁酰辅酶A。出芽酵母中的Esa1p以及其在人体中的同源物Tip60具有2-羟基异丁酰转移酶活性^[89]。p300亦可以催化多种细胞蛋白(如糖酵解相关酶)发生2-羟基异丁酰化修饰。实验证明p300缺失显著降低了包括ENO1在内的关键糖酵解酶的Khib水平, 并降低了它们的催化活性, 使细胞对葡萄糖耗竭诱导的细胞死亡异常敏感^[90]。

4.2 组蛋白去2-羟基异丁酰化酶(histone dehydroxyisobutyrlases, HDHIs)

DAI课题组^[91]于2017年发现H4K8hib水平受细胞内碳来源波动的影响, 进一步发现大量参与糖酵解/糖异生的蛋白被赖氨酸2-羟基异丁酰化修饰, 建立了该修饰与糖代谢之间的联系。同时在体内实验中鉴定到组蛋白赖氨酸去乙酰化酶Rpd3p和Hos3p可以有效去除该位点的修饰。而HDAC2和HDAC3也可以作为体内主要的去2-羟基异丁酰化酶^[89]。在胚胎肾发育过程中, 核中的SIRT3不作为去乙酰化酶发挥功能, 但具有去2-羟基异丁酰化酶活性。SIRT3可以调节核外磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)的Khib的水平, SIRT3缺失增加了PFK的Khib, 促进了糖酵解, 与肾中Khib整体改变、肾元祖细胞减少、肾形成受损和肾元数量减少有关^[92]。

4.3 2-羟基异丁酰化与肿瘤

IFN- α 2b能有效促进HDAC3介导的人肝癌细胞中HBV cccDNA微染色体组蛋白H4K8去2-羟基异丁酰化,从而抑制HBV病毒的转录和复制,这为IFN- α 调控HBV cccDNA微染色体的表观遗传机制提供了新的见解^[93]。

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔最常见的恶性肿瘤,具有侵袭性强、易复发等特点。DAI课题组^[94]在OSCC细胞内鉴定出617个2-羟基异丁酰化蛋白上的938个Khib位点,这些蛋白主要富集于肌动蛋白细胞骨架调控通路中,预测它们可通过改变肌动蛋白的聚集和稳定状态,从而影响和调节OSCC中的肌动蛋白细胞骨架。

5 乳酸化修饰: K1a

2019年ZHAO课题组^[13]发现,乳酸能够促进组蛋白发生乳酸化修饰,直接调节基因的转录,同时在HeLa细胞和小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs)组蛋白中,鉴定到28个乳酸化修饰位点。组蛋白赖氨酸乳酸化(K1a)由细胞外乳酸或葡萄糖来源的细胞内乳酸驱动,在缺氧条件下细胞内乳酸化修饰水平增加。研究人员通过LPS/IFN- γ 或者革兰氏阴性菌进行处理,发现它们均可引起基因启动子处更多的H3K181a并促进非炎症基因如*Arg1*表达水平的增加,而不影响促炎细胞因子基因的表达。以体外重组染色质为底物的体外转录系统实验证明了组蛋白乳酸化修饰直接激活基因转录^[13]。

缺乏B细胞受体相关蛋白(B-cell receptor-associated protein, BCAP)也会导致有氧糖酵解的缺陷和乳酸产生量减少,进而使得组蛋白乳酸化修饰水平降低,修复性巨噬细胞基因表达减少,加剧炎症反应^[95]。

转录因子G1s1可以使衰老细胞重编程为多能细胞,提高基因组的稳定性。在重编程的早期阶段,G1s1结合并开放糖酵解基因的染色质,同时关闭体细胞其他基因的染色质,促进糖酵解。随后更高的糖酵解通量提高细胞乙酰辅酶A和乳酸水平,增强所谓的“第二波”和多能性基因位点的乙酰化(H3K27ac)和乳酸化(H3K181a),促进细胞进入重编程^[96]。

在非小细胞肺癌中G6PD和SDHA蛋白水平升高,乳酸脱氢酶上调与预后不良相关。乳酸能够抑制糖摄取和糖酵解并维持线粒体稳态,其中糖酵解酶(*HK-1*、*PKM*)和三羧酸循环酶(*SDHA*、*IDH3G*)

的mRNA水平分别被乳酸下调和上调。通过ChIP-seq实验在*HK-1*和*IDH3G*基因的启动子处观察到组蛋白乳酸化修饰升高,因此在非小细胞肺癌中,乳酸在一定程度上通过影响组蛋白乳酸化水平,进而介导基因表达,最终调控细胞代谢^[97]。

巨噬细胞可以通过单羧酸转运体(monocarboxylate transporters, MCTs)摄取胞外乳酸,以CBP/p300依赖机制促进HMGB1的乳酸化。发生乳酸化后的HMGB1经分泌体分泌从巨噬细胞释放出来,从而增加内皮通透性。在体内减少乳酸产生或抑制信号转导降低循环分泌体中HMGB1水平,可改善多菌脓毒症预后^[98]。

组蛋白乳酸化也可以通过促进YTH-N6-甲基腺苷RNA结合蛋白2(YTH-N6-methyladenosine RNA-binding protein 2, YTHDF2)的表达促进肿瘤发生,YTHDF2可以识别m6A修饰的抑癌基因*PER1*和*p53*的mRNA并促进两者降解,加速眼黑色素瘤的发生^[99]。

6 异烟酰化修饰: Kinic

组蛋白Kinic是最新发现的一种新型组蛋白翻译后修饰,通过对经异烟肼(isoniazid, IHN)刺激的HepG2细胞进行HPLC-MS/MS检测和分析,研究人员发现了组蛋白上的一种新型酰基化修饰——Kinic。进一步使用制备的特异性泛抗体证实该修饰在多种肿瘤细胞中存在,具有高度的物种保守性。结合同位素标记实验,研究人员证明异烟酰辅酶A(isonicotinyl-CoA)在活细胞中存在,并证明组蛋白Kinic是细胞经INH刺激后产生的内源isonicotinyl-CoA引发的。最后结合生化实验发现,乙酰转移酶CBP/p300可作为异烟酰转移酶介导组蛋白发生异烟酰化修饰,去乙酰化酶HDAC3可作为去异烟酰化酶,降低细胞内异烟酰化修饰水平^[14]。

组蛋白异烟酰化修饰,与乙酰化修饰类似,可引起染色质开放,促进基因转录。结合临床病人样本的组织化学染色及肿瘤细胞的RNA-seq结果,研究人员发现INH诱导的组蛋白Kinic,可提高*PI3KR1*基因表达,进而激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,促进HCC的发生发展,为异烟肼治疗所导致的多种毒副作用和致癌风险机制的阐明提供了新的科学依据^[14]。

7 问题与展望

随着高灵敏质谱技术的发展,蛋白质新型翻译后修饰不断被发现并鉴定,这些翻译后修饰在生命

活动中扮演的角色也越来越清晰。除了挖掘更多的新型翻译后修饰, 针对不同类型修饰进行靶向药物设计, 为临床治疗提供更多的治疗方案迫在眉睫。

同时新型酰基化修饰的结构供体来源于哪些代谢过程, 不同修饰之间是否互相影响, 染色质被修饰后, 对代谢、神经、免疫等过程所产生的效应是否具有独立性等问题都亟待解决。然而值得注意的是, 已有研究发现在*ACLY*基因敲低后, 乙酰辅酶A在细胞质和细胞核中的富集导致了p300催化的Kcr的增加, 但同时p300对两种修饰的催化选择性, 又取决于乙酰辅酶A和巴豆酰辅酶A在细胞内的相对丰度, 这提示不同修饰之间的交互作用是一个复杂的涉及多因素的过程。而在乙酰辅酶A耗尽的情况下, 无论是由于低葡萄糖水平, 还是由于三羧酸循环中葡萄糖碳的转移, 其他酰基辅酶A在结合酰基转移酶方面的竞争将更少, 并将更多地用于修饰组蛋白, 这也提示我们, 在肿瘤细胞复杂的代谢过程中, 不同类型酰基化修饰互相之间可能存在平衡关系, 而理解平衡关系下的具体机制就显得更加重要。

尽管如此, 蛋白质翻译后修饰领域的快速发展, 依旧给了我们许多启发, 新型翻译后修饰的发现以及其机制和功能研究, 更为表观遗传学的探索开拓了新方向, 推动医学事业向前迈出了关键的一步。

参考文献 (References)

- [1] CHEN Y Z, WANG Z Z, WANG Y, et al. nhKcr: a new bioinformatics tool for predicting crotonylation sites on human nonhistone proteins based on deep learning [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(6): bbab146.
- [2] CHEN Z, ZHAO P, LI C, et al. iLearnPlus: a comprehensive and automated machine-learning platform for nucleic acid and protein sequence analysis, prediction and visualization [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(10): e60.
- [3] LÜ H, DAO F Y, GUAN Z X, et al. Deep-Kcr: accurate detection of lysine crotonylation sites using deep learning method [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(4): bbaa255.
- [4] MALEBARY S J, REHMAN M S U, KHAN Y D. iCrotoK-PseAAC: Identify lysine crotonylation sites by blending position relative statistical features according to the Chou's 5-step rule [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0223993.
- [5] SABARI B R, ZHANG D, ALLIS C D, et al. Metabolic regulation of gene expression through histone acylations [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(2): 90-101.
- [6] CHEN Y, SPRUNG R, TANG Y, et al. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(5): 812-9.
- [7] TAN M, LUO H, LEE S, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 1016-28.
- [8] XIE Z, DAI J, DAI L, et al. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(5): 100-7.
- [9] TAN M, PENG C, ANDERSON K A, et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5 [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(4): 605-17.
- [10] DAI L, PENG C, MONTELLIER E, et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(5): 365-70.
- [11] XIE Z, ZHANG D, CHUNG D, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lysine β -hydroxybutyrylation [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(2): 194-206.
- [12] HUANG H, ZHANG D, WANG Y, et al. Lysine benzoylation is a histone mark regulated by SIRT2 [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3374.
- [13] ZHANG D, TANG Z, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation [J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-80.
- [14] JIANG Y, LI Y, LIU C, et al. Isonicotinylation is a histone mark induced by the anti-tuberculosis first-line drug isoniazid [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5548.
- [15] XU W, WAN J, ZHAN J, et al. Global profiling of crotonylation on non-histone proteins [J]. *Cell Res*, 2017, 27(7): 946-9.
- [16] KWON O K, KIM S J, LEE S. First profiling of lysine crotonylation of myofilament proteins and ribosomal proteins in zebrafish embryos [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3652.
- [17] HUANG H, WANG D L, ZHAO Y. Quantitative crotonylome analysis expands the roles of p300 in the regulation of lysine crotonylation pathway [J]. *Proteomics*, 2018, 18(15): e1700230.
- [18] MOELLERING R E, CRAVATT B F. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite [J]. *Science*, 2013, 341(6145): 549-53.
- [19] ROTH S Y, DENU J M, ALLIS C D. Histone acetyltransferases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 81-120.
- [20] FELLOWS R, VARGA-WEISZ P. *In vitro* enzymatic assays of histone deacetylation on recombinant histones [J]. *Bio Protoc*, 2018, 8(14): e2924.
- [21] BAUMANN K. Post-translational modifications: crotonylation versus acetylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(5): 265.
- [22] LIU X, WEI W, LIU Y, et al. MOF as an evolutionarily conserved histone crotonyltransferase and transcriptional activation by histone acetyltransferase-deficient and crotonyltransferase-competent CBP/p300 [J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17016.
- [23] XIAO Y, LI W, YANG H, et al. HBO1 is a versatile histone acyltransferase critical for promoter histone acylations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(14): 8037-59.
- [24] FELLOWS R, DENIZOT J, STELLATO C, et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 105.
- [25] MADSEN A S, OLSEN C A. Profiling of substrates for zinc-dependent lysine deacylase enzymes: HDAC3 exhibits deacetylase activity *in vitro* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(36): 9083-7.
- [26] FELDMAN J L, BAEZA J, DENU J M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread

- deacylation by mammalian sirtuins [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31350-6.
- [27] KELLY R D W, CHANDRU A, WATSON P J, et al. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 complexes regulate both histone acetylation and crotonylation *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14690.
- [28] YU A Q, WANG J, JIANG S T, et al. SIRT7-induced PHF5A decrotonylation regulates aging progress through alternative splicing-mediated downregulation of CDK2 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 710479.
- [29] LI Y, SABARI B R, PANCHENKO T, et al. Molecular coupling of histone crotonylation and active transcription by AF9 YEATS domain [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(2): 181-93.
- [30] ZHAO D, GUAN H, ZHAO S, et al. YEATS2 is a selective histone crotonylation reader [J]. *Cell Res*, 2016, 26(5): 629-32.
- [31] SOSHNIKOVA N V, SHEYNOV A A, TATARSKIY E V, et al. The DPF domain as a unique structural unit participating in transcriptional activation, cell differentiation, and malignant transformation [J]. *Acta Naturae*, 2020, 12(4): 57-65.
- [32] RATAJCZAK W, RYL A, MIZERSKI A, et al. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs) [J]. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66(1): 1-12.
- [33] SABARI B R, TANG Z, HUANG H, et al. Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(2): 203-15.
- [34] LIN H, SU X, HE B. Protein lysine acylation and cysteine succination by intermediates of energy metabolism [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(6): 947-60.
- [35] JO C, PARK S, OH S, et al. Histone acylation marks respond to metabolic perturbations and enable cellular adaptation [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(12): 2005-19.
- [36] LIU S, YU H, LIU Y, et al. Chromodomain protein CDYL acts as a crotonyl-CoA hydratase to regulate histone crotonylation and spermatogenesis [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(5): 853-66.e5.
- [37] YU H, BU C, LIU Y, et al. Global crotonylome reveals CDYL-regulated RPA1 crotonylation in homologous recombination-mediated DNA repair [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(11): eaay4697.
- [38] GOWANS G J, BRIDGERS J B, ZHANG J, et al. Recognition of histone crotonylation by Taf14 links metabolic state to gene expression [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(6): 909-21.e3.
- [39] TANG X, CHEN X F, SUN X, et al. Short-chain enoyl-CoA hydratase mediates histone crotonylation and contributes to cardiac homeostasis [J]. *Circulation*, 2021, 143(10): 1066-9.
- [40] WAN J, LIU H, CHU J, et al. Functions and mechanisms of lysine crotonylation [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7163-9.
- [41] FELLOWS R, DENIZOT J, STELLATO C, et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 105.
- [42] LIAO P, BHATTARAI N, CAO B, et al. Crotonylation at serine 46 impairs p53 activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(3): 730-5.
- [43] HOU J Y, CAO J, GAO L J, et al. Upregulation of alpha enolase (ENO1) crotonylation in colorectal cancer and its promoting effect on cancer cell metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 578: 77-83.
- [44] WU Q, LI W, WANG C, et al. Ultradeep lysine crotonylome reveals the crotonylation enhancement on both histones and non-histone proteins by SAHA treatment [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(10): 3664-71.
- [45] HAN X, XIANG X, YANG H, et al. p300-catalyzed lysine crotonylation promotes the proliferation, invasion, and migration of HeLa cells via heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 [J]. *Anal Cell Pathol*, 2020, 2020: 5632342.
- [46] XU X, ZHU X, LIU F, et al. The effects of histone crotonylation and bromodomain protein 4 on prostate cancer cell lines [J]. *Transl Androl Urol*, 2021, 10(2): 900-14.
- [47] WAN J, LIU H, MING L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 976-82.
- [48] PANT K, PEIXOTO E, RICHARD S, et al. Role of histone deacetylases in carcinogenesis: potential role in cholangiocarcinoma [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 780.
- [49] OLSEN E A, KIM Y H, KUZEL T M, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(21): 3109-15.
- [50] HOU J Y, ZHOU L, LI J L, et al. Emerging roles of non-histone protein crotonylation in biomedicine [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 101.
- [51] SUN M, XU J, WU Z, et al. Characterization of protein lysine propionylation in *Escherichia coli*: global profiling, dynamic change, and enzymatic regulation [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(12): 4696-708.
- [52] CHENG Z, TANG Y, CHEN Y, et al. Molecular characterization of propionyllysines in non-histone proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(1): 45-52.
- [53] FOYN H, VAN DAMME P, STOVE S I, et al. Protein N-terminal acetyltransferases act as N-terminal propionyltransferases *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(1): 42-54.
- [54] LIU B, LIN Y, DARWANTO A, et al. Identification and characterization of propionylation at histone H3 lysine 23 in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32288-95.
- [55] YAN K, ROUSSEAU J, MACHOL K, et al. Deficient histone H3 propionylation by BRPF1-KAT6 complexes in neurodevelopmental disorders and cancer [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(4): eaax0021.
- [56] KING M T, REISS P D. Separation and measurement of short-chain coenzyme-A compounds in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1985, 146(1): 173-9.
- [57] KEBEDE A F, NIEBORAK A, SHAHIDIAN L Z, et al. Histone propionylation is a mark of active chromatin [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(12): 1048-56.
- [58] XU G, WANG J, WU Z, et al. SAHA regulates histone acetylation, butyrylation, and protein expression in neuroblastoma [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(10): 4211-9.
- [59] DOLL S, URISMAN A, OSES-PRIETO J A, et al. Quantitative proteomics reveals fundamental regulatory differences in oncogenic HRAS and isocitrate dehydrogenase (IDH1) driven astrocytoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(1): 39-56.
- [60] HOGH R I, MOLLER S H, JEPSEN S D, et al. Metabolism of short-chain fatty acid propionate induces surface expression of NKG2D ligands on cancer cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(11): 15531-46.

- [61] GAO M, WANG J, ROUSSEAUX S, et al. Metabolically controlled histone H4K5 acylation/acetylation ratio drives BRD4 genomic distribution [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(4): 109460.
- [62] ZHANG Z, TAN M, XIE Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(1): 58-63.
- [63] WANG Y, GUO Y R, LIU K, et al. KAT2A coupled with the alpha-KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase [J]. *Nature*, 2017, 552(7684): 273-7.
- [64] YUAN Y, YUAN H, YANG G, et al. IFN-alpha confers epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome by modulating GCN5-mediated succinylation of histone H3K79 to clear HBV cccDNA [J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 135.
- [65] KURMI K, HITOSUGI S, WIESE E K, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A has a lysine succinyltransferase activity [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(6): 1365-73.
- [66] WAGNER G R, BHATT D P, O'CONNELL T M, et al. A class of reactive acyl-CoA species reveals the non-enzymatic origins of protein acylation [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 823-37, e8.
- [67] YANG G, YUAN Y, YUAN H, et al. Histone acetyltransferase 1 is a succinyltransferase for histones and non-histones and promotes tumorigenesis [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(2): e50967.
- [68] PENG C, LU Z, XIE Z, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(12): M111.012658.
- [69] ZHOU L, WANG F, SUN R, et al. SIRT5 promotes IDH2 desuccinylation and G6PD deglutarylation to enhance cellular antioxidant defense [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(6): 811-22.
- [70] WANG F, WANG K, XU W, et al. SIRT5 desuccinylates and activates pyruvate kinase M2 to block macrophage IL-1beta production and to prevent DSS-induced colitis in mice [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(11): 2331-44.
- [71] LIU X, RONG F, TANG J, et al. Repression of p53 function by SIRT5-mediated desuccinylation at lysine 120 in response to DNA damage [J]. *Cell Death Differ*, 2021, doi: 10.1038/s41418-021-00886-w.
- [72] YU H B, CHENG S T, REN F, et al. SIRT7 restricts HBV transcription and replication through catalyzing desuccinylation of histone H3 associated with cccDNA minichromosome [J]. *Clin Sci*, 2021, 135(12): 1505-22.
- [73] WANG Y, JIN J, CHUNG M W H, et al. Identification of the YEATS domain of GAS41 as a pH-dependent reader of histone succinylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(10): 2365-70.
- [74] BORJIAN F, JOHNSEN U, SCHÖNHEIT P, et al. Succinyl-CoA:mesaconate CoA-transferase and mesaconyl-CoA hydratase, enzymes of the methylaspartate cycle in *Haloarcula hispanica* [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1683.
- [75] GIBSON G E, XU H, CHEN H L, et al. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines [J]. *J Neurochem*, 2015, 134(1): 86-96.
- [76] SADHUKHAN S, LIU X, RYU D, et al. Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(16): 4320-5.
- [77] LIN Z F, XU H B, WANG J Y, et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1): 191-5.
- [78] ZHU D, HOU L, HU B, et al. Crosstalk among proteome, acetylome and succinylome in colon cancer HCT116 cell treated with sodium dichloroacetate [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37478.
- [79] REN M, YANG X, BIE J, et al. Citrate synthase desuccinylation by SIRT5 promotes colon cancer cell proliferation and migration [J]. *Biol Chem*, 2020, 401(9): 1031-9.
- [80] CHEN X F, TIAN M X, SUN R Q, et al. SIRT5 inhibits peroxisomal ACOX1 to prevent oxidative damage and is downregulated in liver cancer [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(5): e45124.
- [81] GAO X, BAO H, LIU L, et al. Systematic analysis of lysine acetylome and succinylome reveals the correlation between modification of H2A.X complexes and DNA damage response in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(6): 1819-30.
- [82] ABRIL Y L N, FERNANDEZ I R, HONG J Y, et al. Pharmacological and genetic perturbation establish SIRT5 as a promising target in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2021, 40(9): 1644-58.
- [83] MA Y, QI Y, WANG L, et al. SIRT5-mediated SDHA desuccinylation promotes clear cell renal cell carcinoma tumorigenesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134: 458-67.
- [84] WANG C, ZHANG C, LI X, et al. CPT1A-mediated succinylation of S100A10 increases human gastric cancer invasion [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 293-305.
- [85] LI X, ZHANG C, ZHAO T, et al. Lysine-222 succinylation reduces lysosomal degradation of lactate dehydrogenase a and is increased in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 172.
- [86] TONG Y, GUO D, YAN D, et al. KAT2A succinyltransferase activity-mediated 14-3-3zeta upregulation promotes beta-catenin stabilization-dependent glycolysis and proliferation of pancreatic carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 1-10.
- [87] GUO Z, PAN F, PENG L, et al. Systematic proteome and lysine succinylome analysis reveals the enhanced cell migration by hypsuccinylation in esophageal squamous cell cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100053.
- [88] WU Q, KE L, WANG C, et al. Global analysis of lysine 2-hydroxyisobutyrylome upon SAHA treatment and its relationship with acetylation and crotonylation [J]. *J Proteome Res*, 2018, 17(9): 3176-83.
- [89] HUANG H, LUO Z, QI S, et al. Landscape of the regulatory elements for lysine 2-hydroxyisobutyrylation pathway [J]. *Cell Res*, 2018, 28(1): 111-25.
- [90] HUANG H, TANG S, JI M, et al. p300-mediated lysine 2-hydroxyisobutyrylation regulates glycolysis [J]. *Mol Cell*, 2018, 70(4): 663-78, e6.
- [91] HUANG J, LUO Z, YING W, et al. 2-Hydroxyisobutyrylation on histone H4K8 is regulated by glucose homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(33): 8782-7.
- [92] PERICO L, MORIGI M, PEZZOTTA A, et al. Post-translational modifications by SIRT3 de-2-hydroxyisobutyrylase activity regulate glycolysis and enable nephrogenesis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23580.
- [93] ZHAO L N, YUAN H F, WANG Y F, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication by promoting HDAC3-mediated de-2-hydroxyisobutyrylation of histone H4K8 on HBV

- cccDNA minichromosome in liver [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, doi: 10.1038/s41401-021-00765-7.
- [94] ZHANG Z, XIE H, ZUO W, et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation proteomics reveals protein modification alteration in the actin cytoskeleton pathway of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Proteomics*, 2021, 249: 104371.
- [95] IRIZARRY-CARO R A, MCDANIEL M M, OVERCAST G R, et al. TLR signaling adapter BCAP regulates inflammatory to reparatory macrophage transition by promoting histone lactylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(48): 30628-38.
- [96] LI L, CHEN K, WANG T, et al. Glis1 facilitates induction of pluripotency via an epigenome-metabolome-epigenome signalling cascade [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(9): 882-92.
- [97] JIANG J, HUANG D, JIANG Y, et al. Lactate modulates cellular metabolism through histone lactylation-mediated gene expression in non-small cell lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 647559.
- [98] YANG K, FAN M, WANG X, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 29(1): 133-46.
- [99] YU J, CHAI P, XIE M, et al. Histone lactylation drives oncogenesis by facilitating m(6)A reader protein YTHDF2 expression in ocular melanoma [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 85.