

## 综述

## 赖氨酸2-羟基异丁酰化修饰的产生、去除及功能

冯进 张硕 万方\*

(内蒙古农业大学, 生命科学学院, 呼和浩特 010010)

**摘要** 赖氨酸2-羟基异丁酰化(lysine 2-hydroxyisobutyrylation, Khib)作为近年来发现的一种翻译后修饰, 其结构和功能与已广泛研究的赖氨酸乙酰化有所不同。最新的质谱法鉴定和定量研究表明, 组蛋白和非组蛋白均可以发生Khib, 但目前尚缺少总结分析Khib的来源及功能的综述。该文总结了Khib的发现和来源, 系统概述了形成和去除该修饰的酶(Writers、Erasers), 以及涉及Khib的蛋白。该文介绍了组蛋白与非组蛋白上的Khib与基因转录调控, 蛋白质翻译、折叠及降解, Khib蛋白参与细胞迁移和调控代谢相关酶功能等方面的相关性。此外, 通过对文献报道的Khib蛋白位点进行汇总及motif分析发现了一种显著的motif特征xxKxK。对文献报道具有Khib的蛋白进行通路富集分析, 富集到了蛋白质的生命周期各个环节, 包括RNA模板的产生以及蛋白质的翻译、定位和降解, 提示Khib可调控蛋白质命运。上述分析与总结不仅揭示了Khib的新功能, 还强调了进一步深入研究Khib机制的必要性。通过探究Khib在不同生物过程中的作用机制, 可以更全面地了解这种翻译后修饰对细胞功能和生物过程的调控作用, 为未来开展相关疾病治疗和生物学研究提供重要的理论基础和启示。

**关键词** PTM; 赖氨酸2-羟基异丁酰化; 肿瘤

## The Production, Removal and Function of Lysine 2-Hydroxyisobutyrylation Modification

FENG Jin, ZHANG Shuo, WAN Fang\*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China)

**Abstract** Khib (lysine 2-hydroxyisobutyrylation), discovered in recent years, is a post-translational modification with distinct structural and functional differences from the well-studied lysine acetylation. Recent mass spectrometry identification and quantification studies have shown that both histone and non-histone proteins can undergo Khib modification. However, there is currently a lack of comprehensive review summarizing the origins and functions of Khib modification. This article summarizes the discovery and sources of Khib, provides a systematic overview of the enzymes involved in the addition and removal of this modification (Writers, Erasers), and highlights proteins affected by Khib modification. The article discusses the relevance of Khib modifications on histone and non-histone proteins to aspects such as gene transcription regulation, protein translation, folding and degradation, influencing cell migration, and regulating metabolic enzyme functions. Additionally, by summarizing the Khib-modified protein sites reported

收稿日期: 2024-01-23

接受日期: 2024-05-06

内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2020MS08032)资助的课题

\*通信作者: Tel: 13404813212, E-mail: fwan@imau.edu.cn

Received: January 23, 2024

Accepted: May 6, 2024

This work was supported by the Natural Fund of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.2020MS08032)

\*Corresponding author. Tel: +86-13404813212, E-mail: fwan@imau.edu.cn

in the literature and conducting motif analysis, a significant motif feature xxKxK is discovered. Pathway enrichment analysis of proteins with Khib modification reported in the literature reveals all aspects of the protein life cycle, including the production of RNA templates, and the translation, localization and degradation of proteins, suggesting that Khib can regulate protein fate. The above analysis and summary not only reveal new functions of Khib but also emphasize the necessity for further in-depth research into the mechanisms of Khib. By exploring the action mechanisms of Khib in different biological processes, a more comprehensive understanding of how this post-translational modification regulates cellular functions and biological processes can be achieved, providing important theoretical foundations and insights for future disease treatments and biological studies.

**Keywords** PTM; lysine 2-hydroxyisobutyrylation; tumors

蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM), 在各种生物途径中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。随着基于质谱的蛋白质组学的应用, 新型组蛋白PTM不断被报道, 从较小的化学修饰, 如乙酰化和磷酸化, 到涉及添加完整蛋白质的修饰, 如泛素化<sup>[3-4]</sup>。蛋白质PTM发生在所有生物体中, 并控制许多重要的细胞过程, 包括酶的激活与失活以及蛋白质的合成、降解与定位。赖氨酸由于侧链有氨基, 可发生多种修饰<sup>[5]</sup>, 是PTM的主要研究对象。

赖氨酸侧链末端氨基可发生甲基化、泛素化、硝化、乳酸化和酰化等修饰, 其中酰化修饰种类繁多, 修饰中和了侧链氨基的正电荷, 通过改变蛋白质的构象影响其功能<sup>[6]</sup>。根据侧链长度、疏水性和电荷的差异, 赖氨酸酰化分为乙酰化、丙酰化、丙二酰化、丁酰化、2-羟基异丁酰化、 $\beta$ -羟基丁酰化、琥珀酰化、戊二酰化和巴豆酰化<sup>[7-12]</sup>。2-羟基异丁酰化是一种近年来发现的蛋白质修饰<sup>[8]</sup>, 多项研究表明其调控了基因转录、DNA损伤修复和糖代谢等生物学过程, 与一些疾病的发生和发展密切相关<sup>[8,13-23]</sup>。

目前对于赖氨酸2-羟基异丁酰化(lysine 2-hydroxyisobutyrylation, Khib)如何影响蛋白质功能尚不完全清楚, 但一些初步研究显示, Khib可能通过改变蛋白质的电荷、空间构象和互作伴侣来调节其功能。此外, Khib的存在也使得其他修饰不能发生, 即占位效应。2020年DAI等<sup>[24]</sup>发表了一篇关于Khib功能的综述, 分析了赖氨酸Khib位点, 以了解其功能和活性。本文收集目前所有关于人中Khib位点的文献, 通过重分析相关数据揭示其可能的功能, 为进一步研究提供新的方向和思路。

## 1 赖氨酸2-羟基异丁酰化的发现与来源

ZHAO等<sup>[8]</sup>于2014年首次报道了组蛋白Khib的

存在。在这项研究中, 他们通过质谱分析首次发现了这种组蛋白标记, 并使用化学和生化方法开展了进一步验证, 发现组蛋白Khib与基因转录和染色质结构相关。后续多篇文章报道了全蛋白组范围内检测到的Khib, 发现其分布广泛, 对多种生物学过程起到调控作用。

Khib来源于2-羟基异丁酰辅酶A, 后者一般被认为来源于2-羟基异丁酸(2-hydroxyisobutyrate, 2-HIBA); 即使存在其他短链酰基辅酶A经过碳骨架重构产生2-HIBA-CoA的可能性, 考虑到多种体液中普遍存在2-HIBA, 它很可能是2-HIBA-CoA合成的主要前体, 即Khib的间接来源<sup>[8]</sup>。

已知2-HIBA可由细菌代谢宿主未消化完全的膳食蛋白产生<sup>[25]</sup>, 2-HIBA可能是肠道菌群产生的多种能调控机体神经活动及免疫状态的短链脂肪酸之一。

已在人体多种生物体液(包括血液、尿液、唾液和尿液)中检测到微摩尔浓度的2-HIBA<sup>[26-31]</sup>, 肥胖患者及糖尿病人尿液中2-HIBA含量比正常人更高, 并与特定肠道微生物群的存在有关<sup>[32-33]</sup>。酒精摄入后尿液2-HIBA与乳酸水平具有很强的相关性, 提示其可能与糖酵解有关。上述肥胖、糖尿病、酒精摄入的情况均与氧化压力有关, 因此2-HIBA产生或与氧化应激有关。通过在细菌培养中提供不同的碳源发现: 外源补充葡萄糖、丙酮酸能够提高体内Khib的水平<sup>[34]</sup>, 提示细菌中Khib的发生依赖于糖酵解。

2-HIBA可在多种实体瘤组织及血液中检出: 肺癌病人血液中可测得2-HIBA, 其水平在手术后上升<sup>[35]</sup>, 胃癌组织中也可测得高于正常人的2-HIBA水平<sup>[36]</sup>。由iPS(induced pluripotent stem cell)细胞分化来的心肌细胞经阿霉素处理后其培养基中可检测到2-HIBA<sup>[37]</sup>, 提示2-HIBA可能为细胞代谢产物。2-HIBA是合成2-羟基异丁酰辅酶A的前体, 后者介

导广泛的组蛋白 Khib<sup>[8]</sup>。2-HIBA修饰可发生在大肠杆菌、酵母及哺乳动物细胞中, 是一种广泛存在的 PTM。

综上所述, 2014年 ZHAO等<sup>[8]</sup>首次报道了组蛋白 Khib的存在, 揭示了其与基因转录和染色质结构相关, 后续发现了多种蛋白质上均存在 Khib; 其修饰来源 2-HIBA可由细菌代谢形成, 存在于肥胖、糖尿病患者及酒精摄入后健康人的尿液及多种实体瘤组织中。

## 2 赖氨酸2-羟基异丁酰化形成的酶(Writer)

目前已发现多种真核生物组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)具有2-羟基异丁酰转移酶(histone 2-hydroxyisobutyryltransferase, HIBIT)活性。HAT根据序列和结构特征可分为3个主要家族: p300/CBP(CREB结合蛋白 KAT3A、KAT3B)、GNAT(Gcn5相关N-乙酰转移酶, KAT2A、KAT2B)和 MYST(MOZ、Ybf2/Sas3、Sas2、KAT5、KAT6A、KAT6B、KAT7、KAT8)家族<sup>[38-39]</sup>。其中p300/CBP和 MYST家族仅存在于真核细胞中, GNAT则存在于不同物种中。

HUANG等<sup>[13]</sup>报道人类 HCT116细胞系中p300同时具有催化乙酰化、琥珀酰化和Khib活性。研究表明, p300介导的Khib可对糖酵解相关酶功能产生影响, 并与糖酵解通路中关键酶(包括 GPI、PFK1、ALDO、PGK、ENO、GAPDH和PKM2)的调节相关。这强调了p300介导的Khib在调节糖酵解中的重要性。此外, MYST家族的Tip60也被发现具有Khib催化活性<sup>[17]</sup>, 并通过调节多个生物过程中涉及的关键蛋白质的Khib水平来发挥作用。实验表明, Tip60通过与其他蛋白质互作, 调节了多个生物过程中所涉及的关键蛋白质的Khib水平。这些过程包括基因转录、染色质结构重塑以及细胞命运决定等。此外, ZHAO等<sup>[40]</sup>证明Tip60的酵母同源物 ESA1(Esa1, the NuA4 complex catalytic subunit)可以在体外和体内将Hib-CoA修饰到底物蛋白上。研究者敲除酵母中一系列非必需的赖氨酸乙酰转移酶(lysine acetyltransferases, KATs)后发现, H3K8hib修饰水平未明显改变。对必需KAT ESA1进行核心功能结构域解析和实验验证显示, ESA1的催化口袋可以同时容纳乙酰基团和Hib基团。在温敏突变株 ESA1-531中, 37 °C下H4K8hib修饰几乎消失, 而点突变株 L264D和F312D中H4K8hib修饰水平显著降

低。破坏含有ESA1亚基的picNuA4和NuA4复合物也导致H4K8hib修饰水平下降。体外实验表明, 在Hib-CoA存在时, ESA1能够催化H4K8hib修饰的形成。这些实验证明, ESA1在体内外都能执行Khib转移酶功能, 并且还能催化其他修饰如甲基化、乙酰化和泛素化。

Khib是一个动态可逆的过程, 为了寻找调控 NAT10 K823-Khib的产生酶和去除酶, LI等<sup>[14]</sup>结合免疫共沉淀和分子实验, 发现MYST家族的KAT7产生了 NAT10 K823-Khib。进一步分析发现KAT7在食管癌组织中呈现高表达且与NAT10 K823-Khib水平呈正相关。在细菌中, tRNA胞嘧啶乙酰转移酶 Ypfi通过产生Khib<sup>[41]</sup>调控基因转录和细菌耐酸性。

总体而言, 目前已知的真核生物中的“Writer”主要来自p300/CBP和MYST家族, 未见于GNAT家族成员中。然而, 细菌中Ypfi具有GNAT结构域, 提示GNAT结构域或具有HIBIT活性。“Writer”的多样性提示Khib可能参与多种生物过程的调控。值得注意的是, 这些已知的“Writer”大多来自细胞核, 只有p300具有在细胞核和细胞质之间穿梭的能力。

## 3 去除赖氨酸2-羟基异丁酰化的酶(Eraser)

类似于HAT对Khib的催化作用, 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)也能去除Khib, 即具有去2-羟基异丁酰化酶(2-hydroxyisobutyryl dehydrogenase, HDHIB)活性<sup>[40]</sup>。HDAC可分为四类: 其中I/II/IV类依赖Zn<sup>2+</sup>, III类即Sirtuin家族依赖NAD<sup>+</sup>, 研究表明III类与I类Rpd3家族成员(HDAC1、2、3和8)和II类Hda1家族成员(HDAC4、5、6、7、9和10)可去除Khib<sup>[42-44]</sup>。

HDAC2和HDAC3具有去除Khib活性。HUANG等<sup>[40]</sup>通过体外实验对HDAC家族中11个成员的去除Khib活性进行筛选, 发现HDAC2和HDAC3具备去除Khib活性。在HEK293T细胞系中观察到, 单独或联合敲除和过表达HDAC2和HDAC3时, Khib水平显著降低, 表明它们在人类细胞中扮演着去除Khib的角色<sup>[17]</sup>; 它们不仅去除Khib, 还去除乙酰化、丁酰化、戊酰化、琥珀酰化修饰, 底物较为广泛。

Sirtuin家族成员SIRT2、SIRT3和SIRT7也具有去除乙酰化、丁酰化、丙酰化、琥珀酰化和泛素化活性。其中SIRT3具有去除Khib活性, 并调节三羧

表1 本综述中讨论的写入者和去除者

Table 1 Writers and Erasers discussed in this review

| 类别<br>Category | 名称<br>Name | 家族<br>Family | 生物样本<br>Biological samples | 文献来源<br>Reference |
|----------------|------------|--------------|----------------------------|-------------------|
| Writers        | Tip60      | MYST         | HEK293T cell line          | [17]              |
|                | p300       | P300/CBP     | HCT116 cell line           | [13]              |
|                | Esa1p      | MYST         | Yeast                      | [37]              |
|                | Ypfi       | None         | Bacteria                   | [41]              |
|                | KAT7       | MYST         | Esophageal cancer tissue   | [14]              |
| Erasers        | Rpd3p      | Rpd3         | Yeast                      | [37]              |
|                | Hos3p      | Rpd3         | Yeast                      | [37]              |
|                | HDAC2      | Rpd3         | HEK293T cell line          | [17]              |
|                | HDAC3      | Rpd3         | HEK293T cell line          | [17]              |
|                | CobB       | Sirtuin      | Bacteria                   | [41]              |
|                | SIRT3      | Sirtuin      | Mouse                      | [16]              |
|                | SIRT7      | Sirtuin      | Esophageal cancer tissue   | [14]              |

酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)和肾脏发育<sup>[16]</sup>。在肾脏发育过程中, SIRT3调控的一个重要蛋白是TCA中的顺乌头酸酶(aconitase 1, ACO1), 其Khib会抑制ACO1的活性, 从而影响TCA。LI等<sup>[14]</sup>结合免疫共沉淀和分子实验, 发现SIRT7是NAT10 K823-Khib的去修饰酶。ZHANG等<sup>[45]</sup>在细菌研究中发现一种与SIRT2类似的HDAC CobB也具有去除Khib的活性。通过对体内CobB的敲除和过表达体系中Khib水平的检测等实验, 证实了CobB具有去除Khib的活性, 同时表征了其酶亲和力及动力学规律, 并进一步确定了R58是CobB去除Khib酶活性的关键位点, 又借助多肽水平实验, 观测到了小分子抑制剂对这一酶活性的影响, 系统验证了CobB去除Khib的活性。

此外, 在酵母研究中发现, H4K8上的Khib去除涉及两种HDACs, Rpd3p和Hos3p<sup>[46]</sup>。通过实验观察和基因敲除, 研究人员试图鉴定H4K8上去除Khib的酶。然而, 在筛选了酵母敲除(yeast knockout, YKO)集合中10个HDAC缺失突变体后, 并没有发现能够增强H4K8hib信号的突变体。这表明这些突变体要么无法去除这种修饰, 要么无法检测到增加的修饰。进一步的实验发现, 使用水代替培养基处理细胞会导致营养物质缺乏并造成H4K8hib信号强度在30分钟内降低, 提示在这个过程中需要HIBIT的参与, 在Rpd3Δ和Hos3p双突变体中, H4K8hib的信号强度在水处理后保持恒定, 表明Rpd3Δ和Hos3p协调去除H4K8上Khib。

综上所述, 目前对Khib去除者的报道主要涉及

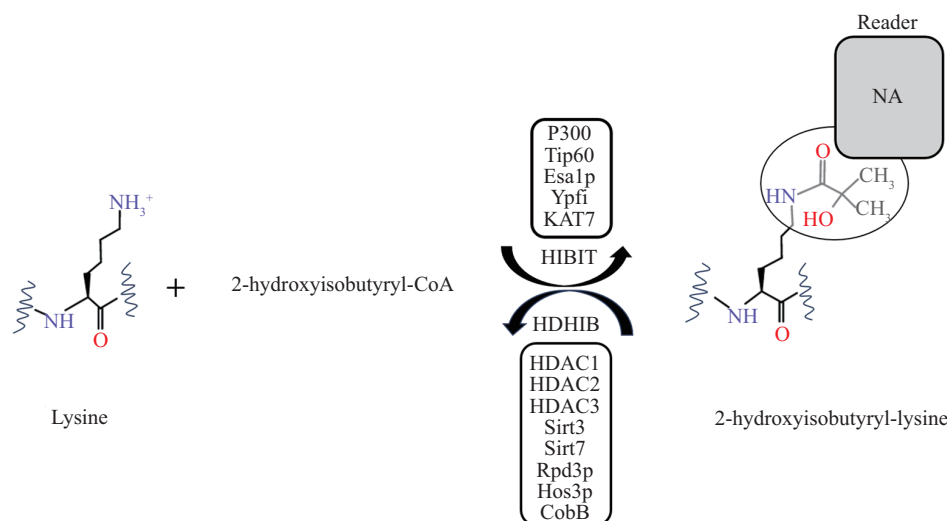
I/II/III类家族, 目前未见IV类家族有去除Khib的报道, 哺乳动物中IV类家族只有一个成员HDAC11。由于酵母去乙酰化酶Hos3与HDAC11结构域有同源性, 且HDAC11与I/II HDAC家族共享催化结构域, 推测HDAC11也可能具有去除Khib的功能。上述去除者中HDAC3和SIRT7定位在细胞核, HDAC2和SIRT2可以在细胞核和细胞质之间穿梭, SIRT3可以在细胞核和线粒体之间穿梭。

与写入者类似, 已报道的Khib去除者种类也较多, 见于除了IV类之外的所有HDAC类别, 提示Khib本身也可能参与了广泛的生物学过程, 具有与乙酰化修饰类似的复杂性, 对其功能的揭示将为深入理解代谢调控机制奠定基础。我们将Khib的写入者和去除者总结为表1和图1。

#### 4 识别特定赖氨酸2-羟基异丁酰化的蛋白质(Reader)

组蛋白酰化修饰经常作为对接标记来招募下游读取器。目前显示有3个主要结构域参与组蛋白乙酰化和非乙酰化修饰的读取: 溴结构域(Bromodomain, BRD)、双PHD锌指(DPF)和YEATS。此外, 酵母Rtt106的双PH结构域、人类p300和ZZZ3的ZZ结构域, 也被报道为组蛋白乙酰化读取器<sup>[47]</sup>。

写入者和去除者对Khib的作用已经初步明确, 但读取者的角色尚不清楚。是否有专门的读取者识别Khib, 或者与Kcr共享相同的读取者? 这些问题值得我们深入挖掘和揭示。



目前已报道的Khib写入者(HIBIT)及去除者(HDHIB)。NA: 还没有得到。

Khib Writers (HIBIT) and Removers (HDHIB) have been reported so far. NA: not available.

图1 蛋白质2-羟基异丁酰化通过HIBIT和HDHIB取得动态平衡并招募读取者

Fig.1 Protein 2-hydroxyisobutyrylation achieves dynamic equilibrium through HIBIT and HDHIB and recruits Readers

## 5 赖氨酸2-羟基异丁酰化修饰的功能

### 5.1 组蛋白Khib功能

研究表明, Khib在精子细胞的形成过程中扮演关键角色<sup>[8]</sup>。其可能参与精子细胞的分化、成熟和功能激活等关键步骤。这种修饰通过改变染色质状态、影响基因表达和调节精子细胞特定的信号通路来实现其调控作用。

组蛋白Khib通过调节染色质结构、基因启动子活性以及结合转录因子等机制来影响生精细胞的基因表达。研究发现, 在雄性生殖细胞分化过程中, 组蛋白Khib表现出与组蛋白Kac或组蛋白Kcr不同的基因组分布模式。通过染色质免疫沉淀测序、基因表达分析和免疫检测, 研究者发现在减数分裂及减数分裂后的雄性生殖细胞中, H4K8hib与细胞中的活跃基因转录相关。精子组蛋白Khib标记在不同物种中保守且广泛分布, 并可引起较大的结构变化, 在染色质功能调节中发挥关键作用。

肾脏发育异常会导致肾单位数量减少, 动物在成年后容易患上肾脏疾病。在小鼠胚胎肾脏中, 这些细胞的自我更新和分化需要一种相对抑制的染色质状态<sup>[13,16]</sup>。PERICO等<sup>[16]</sup>发现了去除Khib的SIRT3在肾脏发育中的新作用。在胚胎肾脏中, SIRT3高度表达, 定位于核内和核外。核SIRT3不充当HDAC, 但对组蛋白的赖氨酸残基发挥去除Khib活性的作用, 小鼠基因敲除SIRT3引起肾祖细胞减少, 提示Khib参与了这一过程。对于Khib在此环境中起到的

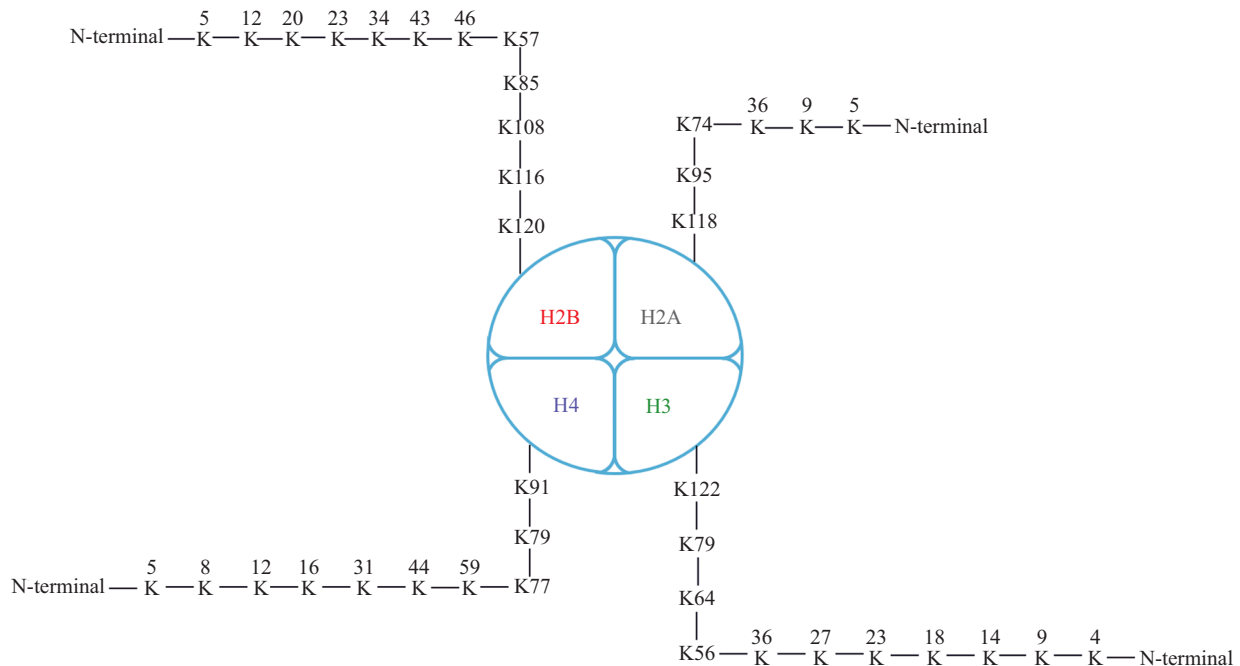
转录调控作用的机制尚未明确。

细菌具有与组蛋白类似的“类组蛋白”。如前所述, DONG等<sup>[41]</sup>揭示了大肠杆菌中Ypfi作为Khib的写入者, 在类组蛋白上写入Khib并调节转录: 抑制类组蛋白H-NS上的K121hib导致H-NS与DNA的解离, 从而促进多种基因的转录, 其中抗酸基因表达提高了细菌耐酸性, 表明细菌中Khib通过修饰类组蛋白调控转录。

总之, 组蛋白Khib在精子及肾脏发育中均参与了转录调控, 从而影响了发育过程。细菌中类组蛋白Khib也调控基因转录。我们总结了文献中所报道的组蛋白H2A、H2B、H3和H4上的Khib位点(图2)。

### 5.2 非组蛋白Khib功能

5.2.1 蛋白质翻译、折叠及降解 核糖体、蛋白酶体组分上均可测得Khib, 提示Khib可能调控蛋白质翻译及降解过程。YANG等<sup>[20]</sup>比较了猪卵巢组织中具有Kcr和Khib的蛋白质, 共鉴定出了653个兼有二者的蛋白质。GO(Gene Ontology)富集分析显示, 这些差异修饰蛋白(differentially modified protein, DMP)在核小体组织、染色质组装、DNA包装、多肽生物合成和多肽代谢过程中显著富集。KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析显示DMP在蛋白酶体和核糖体通路显著富集。其中, 15个DMP与蛋白酶体途径相关, PSMC6和PSMB7是核心蛋白。此外, 蛋白酶体亚基中Kcr和Khib的显著变化可能参与了卵母细胞发育过程中的



文献中所报告的组蛋白H2A、H2B、H3和H4上的Khib位点。

Khib sites on histones H2A, H2B, H3 and H4 reported in the literature.

图2 人类组蛋白2-羟基异丁酰化位点的图示

Fig.2 Schematic representation of the 2-hydroxyisobutyrylation site of human histones

细胞周期调控。另外,44个具有Kcr和Khib的DMP与核糖体途径相关,提示这些共修饰蛋白可能参与了卵母细胞发育过程中的蛋白质合成。

除了参与蛋白质的合成及降解外,Khib也存在于热休克蛋白上,提示其参与蛋白质的折加工。XIE等<sup>[19]</sup>研究表明Kcr和Khib可能在系统性红斑狼疮(stochastic loewner evolution, SLE)患者中促进抗原呈递,并鉴定出6个涉及抗原加工和呈递途径的DMP(CLTIC、HSPA1B、HSPA8、HSP90AB1、HSPD1和PDIA3),其中HSPA8是核心蛋白。HSPA8的Kcr和Khib变化可能使ATP水解并促进抗原与MHC II分子的结合。

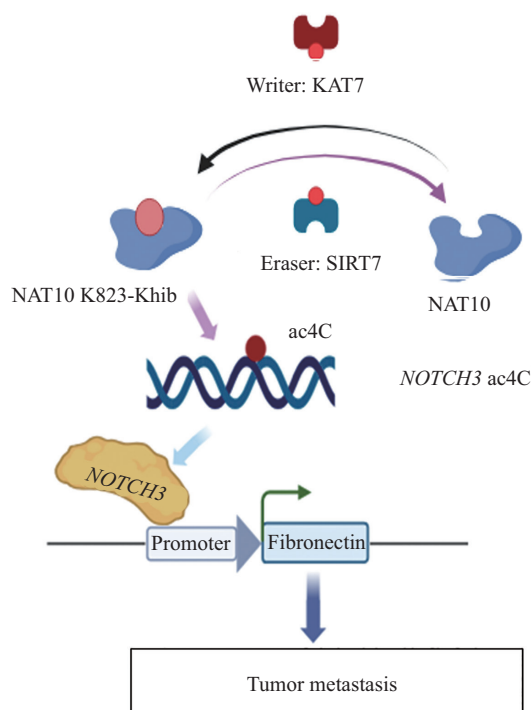
**5.2.2 参与细胞迁移** 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔最常见的恶性肿瘤之一,具有高度侵袭性和易复发性。ZHANG等<sup>[22]</sup>利用LC-MS/MS的蛋白质组学揭示了在OSCC中Khib的变化,其中在调控肌动蛋白聚合的通路中测得了上调的Khib修饰蛋白,包括PFN、P14P5K、Rac和ERM等。这提示Khib的增加导致了细胞骨架异常重塑、细胞迁移和侵袭能力增强,从而促进了OSCC的发展。

LIAO等<sup>[14]</sup>通过比较转移模型和临床样本中非组蛋白赖氨酸酰化修饰,发现Khib在转移瘤组织中

显著上调。通过对20例食管癌原发灶及其相应转移瘤样本进行蛋白质组学分析,发现具有Khib的N-乙酰转移酶10(N-acetyltransferase 10, NAT10)在肿瘤转移中起驱动作用。NAT10上K823hib促进了它与去泛素化酶USP39的结合,从而提升了NAT10蛋白的稳定性。NAT10催化了NOTCH3(Notch homolog 3) mRNA上胞嘧啶4位发生乙酰化修饰(ac4C),增强了mRNA的稳定性(图3),从而促进了肿瘤侵袭转移。

XIE等<sup>[19]</sup>研究表明Kcr和Khib可能在SLE患者中调节白细胞迁移介导的组织损伤,在SLE的发病机制中扮演关键角色。GO富集分析显示,这些DMP在白细胞迁移方面显著富集。KEGG通路富集分析表明这些DMP参与了白细胞跨内皮迁移途径。在白细胞跨内皮迁移途径中,鉴定出7个DMP(ACTN1、ACTN4、EZR、MSN、RAC1、RHOA和VCL),其中MSN是该途径中修饰位点最多的蛋白质。MSN氨基末端ferm区Kcr和Khib的变化可能影响白细胞与内皮细胞之间的黏附,是白细胞迁移的重要步骤。这些研究结果有助于深入了解SLE的发病机制,并为相关治疗策略的开发提供重要线索。

**5.2.3 调控代谢相关酶功能** 这些研究表明Khib在调控糖代谢相关酶的水平 and 活性方面发挥重要



2-羟基异丁酰化修饰增强NAT10蛋白质稳定性进而促进NOTCH3 mRNA的ac4C修饰。

2-hydroxyisobutyrylation modification enhances the stability of NAT10 protein and thereby promotes ac4C modification of NOTCH3 mRNA.

图3 蛋白质Khib及RNA乙酰化修饰促进肿瘤转移

Fig.3 Protein Khib and RNA acetylation modification promote tumor metastasis

作用,对肿瘤细胞的生长、能量代谢和肿瘤微环境具有重要影响。目前已确认多个与糖酵解和三羧酸循环相关的酶(包括 GPI、PFK、ALDO、GAPDH、PGK、GPMA、ENO和PKM等)具有 Khib<sup>[16]</sup>(图4)。这些结果揭示了 Khib在代谢通路中的调控机制,但其具体作用及影响仍需进一步研究阐明。

在膀胱癌中,乙醛脱氢酶1家族A1(aldehyde dehydrogenase 1A1, ALDH1A1)上K260hib会影响其稳定性,并对膀胱癌的进展产生调节作用。ALDH1A1是定位于胞质的酶,催化多种醛类包括乙醛、视黄醛、脂质过氧化产生的丙二醛、己醛等转变为羧酸,参与乙醇代谢、维生素A合成、脂质过氧化清除等多种代谢过程<sup>[48]</sup>。在肿瘤中,ALDH1A1是干细胞标记物,与肿瘤干性和耐药性相关。研究人员发现,在膀胱癌组织样本中,ALDH1A1蛋白的K260hib修饰降低了ALDH1A1蛋白的表达水平,从而影响了细胞增殖、侵袭和转移等关键过程,抑制了膀胱癌进展。这一发现为深入理解膀胱癌干性和耐药性的分子机制提供了新线索,并为开发针对膀胱癌的治疗药物提供了潜在靶点。

YANG等<sup>[20]</sup>在猪卵巢组织中检测到653个DMP,通过KEGG通路分析发现这些DMP显著富集到脂肪

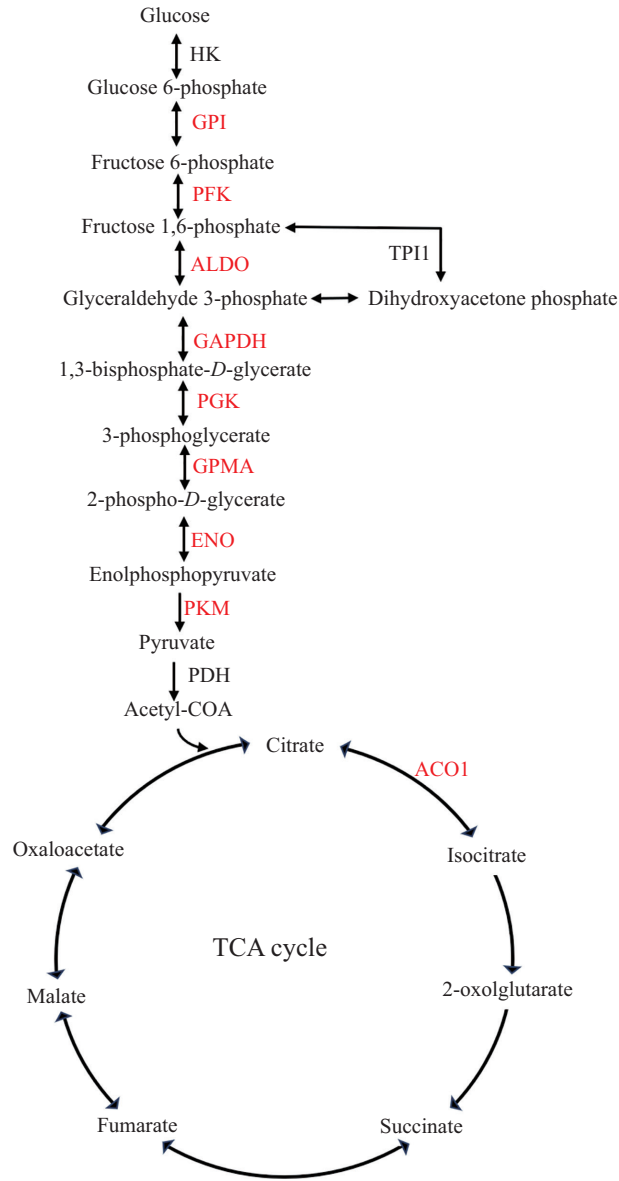
酸延伸、丙酮酸代谢和磷酸戊糖3个通路上,这与我们的KEGG富集分析结果相似。

糖代谢是肿瘤细胞生长和存活所必需的过程,而Khib可能参与调控糖代谢的多个酶水平及活性,对细胞的生长、能量代谢和肿瘤微环境等方面产生重要影响,但其具体作用或机制有待进一步阐明。我们查阅了2篇文献发现糖酵解的10个酶中有8种(GPI、PFK、ALDO、GAPDH、PGK、GPMA、ENO和PKM)被Khib, TCA中有1种酶(ACO1)被Khib(图4)。

综上所述, Khib在蛋白质翻译、肿瘤迁移与侵袭、免疫和代谢中发挥重要作用,尤其是代谢中已发现受Khib调控的酶种类繁多,提示 Khib对代谢具有重要调节作用。

### 5.3 具有Khib的蛋白质的生物信息学分析

虽然以上研究揭示了 Khib在多种生物学过程中的功能,但还缺少一个综合全面的分析。Khib可在蛋白质结构和功能上引起变化,从而调节其参与的信号转导、基因表达和代谢途径。但目前尚缺少全面分析 Khib功能的综述,为此我们收集了目前发表的所有检测人组织/细胞(HeLa、HCT116、HEK293T、口腔鳞状细胞癌组织、胰腺癌组织、食管癌组织)中 Khib

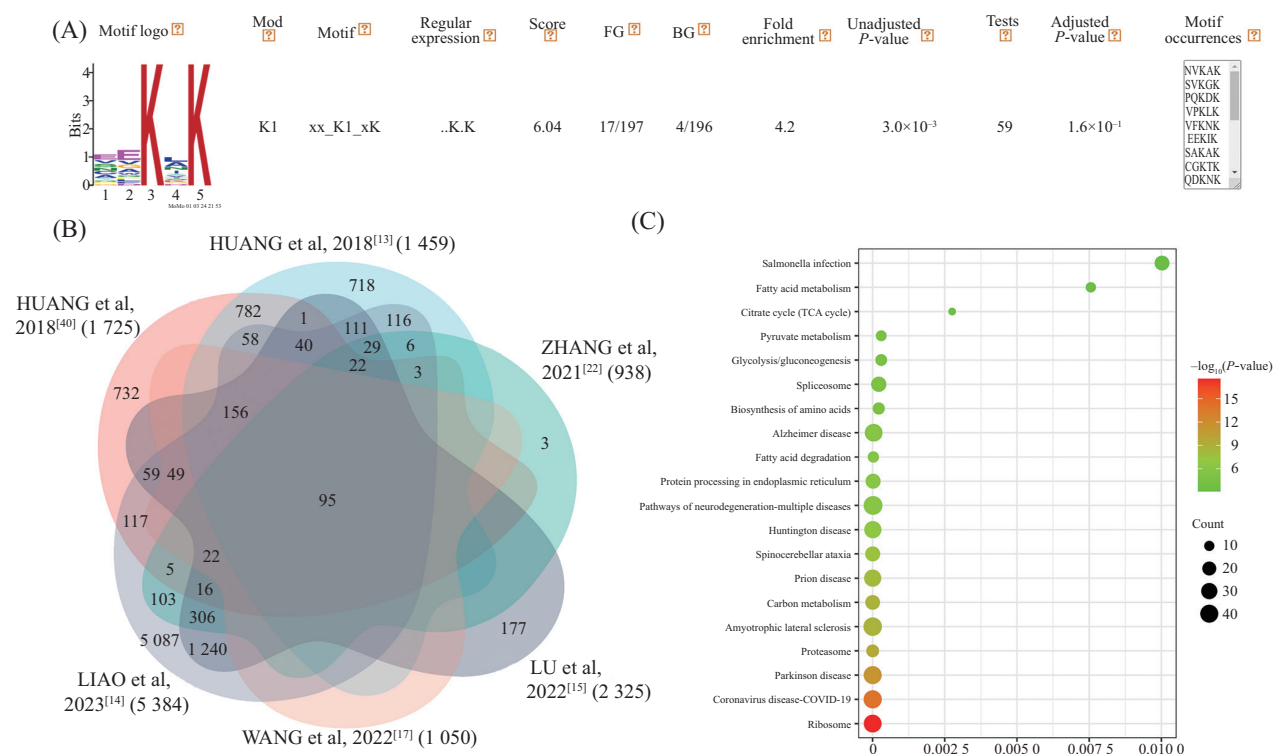


红色为Khib修饰酶。  
Red is Khib modification enzyme.

图4 糖酵解和TCA中发生Khib的蛋白酶  
Fig.4 Proteases that generate Khib in glycolysis and TCA

表2 本综述讨论的2-羟基异丁酰化研究  
Table 2 2-hydroxyisobutyrylation studies discussed in this review

| 生物样本<br>Biological samples      | Khib位点数<br>Number of Khib sites | Khib蛋白数<br>Number of Khib proteins | 发表年份<br>Year of publication | 文献来源<br>References |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| HCT116 cell line                | 4 239                           | 1 459                              | 2018                        | [13]               |
| <i>Giardia lamblia</i>          | 8 877                           | 1 546                              | 2021                        | [23]               |
| Oral cancer tissue              | 938                             | 617                                | 2021                        | [22]               |
| Pancreatic cancer tissue        | 10 367                          | 2 325                              | 2022                        | [15]               |
| HEK293T cell line               | 3 502                           | 1 050                              | 2022                        | [17]               |
| Crossbred piglet ovarian tissue | 4 498                           | 1 127                              | 2023                        | [20]               |
| Esophageal cancer tissue        | 56 030                          | 5 384                              | 2023                        | [14]               |



A: Khib修饰肽motif分析。B: 维恩图显示2-羟基异丁酰化修饰的重叠蛋白质。C: Khib重叠DMP蛋白质通路富集分析。

A: motif analysis of Khib modified peptide. B: Venn diagram showing overlapping proteins modified by 2-hydroxyisobutyrylation. C: pathway enrichment analysis of Khib overlapping DMP proteins.

图5 Khib蛋白富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of Khib modified proteins

的6篇文章<sup>[13-15,17,22,40]</sup>, 其中共报道Khib位点81 624个, 去掉重复后的总Khib位点有59 683个(表2), 为了进一步分析Khib位点共有的特征及功能, 我们收集了在6组数据的4组中具有Khib的蛋白质, 将其命名为Khib蛋白交集, 共有429个蛋白质<sup>[49]</sup>(图5B), 其上有Khib位点708个。利用MOMO软件开展motif特征分析, 设置氨基酸宽度为5个, 富集到了一种显著的motif特征<sup>[50]</sup>(图5A)。

为了了解Khib蛋白的功能, 对前述Khib蛋白交集进行生信富集分析, 通过DAVID数据库<sup>[51]</sup>进行KEGG、GO富集分析, KEGG结果显示这些蛋白富集于核糖体、神经退行性疾病相关通路和碳代谢通路<sup>[52]</sup>(图5C)等, 目前未见Khib与神经退行性疾病相关的报道, 但发现其富集于中心碳代谢及核糖体通路中<sup>[15,45]</sup>。GO富集分析结果显示富集的生物学过程有翻译、mRNA剪接、蛋白质折叠和核糖体小亚基生物学合成过程等, 细胞亚定位结果显示蛋白质定位在外泌体、细胞质、细胞膜、黏着斑和核糖体等上, 分子功能结果显示蛋白质在RNA拼接、蛋白质结合、钙黏素结合、ATP水

解酶和mRNA拼接功能上显著富集<sup>[52]</sup>(图6A), 这些GO功能条目与我们富集到的核糖体等通路均与蛋白质的生命周期有关, 涉及了RNA模板的产生以及蛋白质翻译、定位和降解, 提示Khib可调控蛋白质命运。

## 6 赖氨酸上多种修饰的互作

由于Khib与其他修饰可发生在同一个赖氨酸上, 因此与其他修饰存在互斥, 形成复杂的修饰网络, SOD2 K122上可发生的Kace与Khib即是一个例子。Kcr与Khib也共存于前述仔猪卵巢组织653个蛋白中, 以及SLE中的76个蛋白中<sup>[20]</sup>。但同时也有大量仅有Khib的独特位点: ZHAO等<sup>[8]</sup>发现在63个人和小鼠组蛋白Khib位点中, 有27个未被乙酰化和巴豆酰化修饰。HUANG等<sup>[13]</sup>发现p300在不同的赖氨酸位点上差异性地调节Khib和Kac, 149个Khib位点与693个Kac位点中只有6个重合; 多种细胞蛋白, 特别是糖酵解酶, 是Khib的p300的靶标, 但Kac则不然。由此可见, 蛋白上存在大量独特的Khib位点, 提示Khib具有除乙酰化等修饰之外的功能。

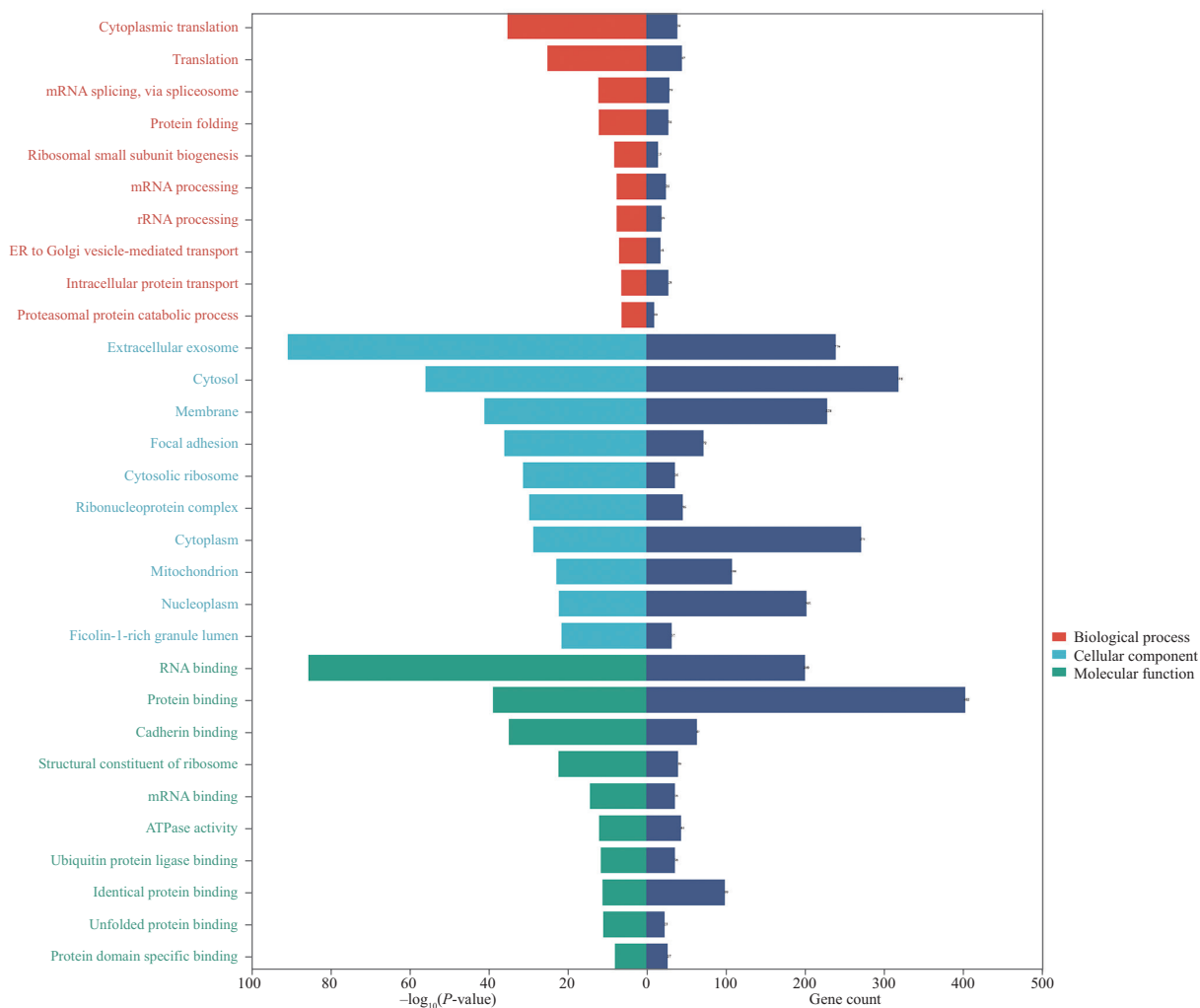


图6 Khib蛋白的GO富集分析

Fig.6 GO enrichment analysis of Khib modified proteins

## 7 总结与展望

综上所述, 本文在总结近年来Khib相关文献的基础上, 按组蛋白和非组蛋白对Khib功能进行了汇总。通过对文献报道Khib蛋白位点进行汇总及motif分析发现了一种显著的motif特征xxKxK。对文献报道具有Khib的蛋白进行通路富集分析, 发现这些蛋白富集于核糖体、神经退行性疾病和碳代谢通路, 尤其是糖酵解通路中。

目前已发表的研究提供了Khib在蛋白组上的分布, 并鉴定了“写入者”和“去除者”。这些结果不仅提高了我们对Khib的理解, 也为进一步研究其在生物学过程中的功能和潜在应用提供了重要线索。关于Khib的工作目前仍处于起步阶段, 还有很多问题有待解答, 其中一个重要问题是: 酰基辅酶A的代谢如何调控Khib水平? 酰基辅酶A在细胞内参与能量代谢和生物合成过程, 可能通过调节Khib形成或

降解的途径来影响Khib的水平。

针对Khib的潜在治疗干预, 可以通过开发针对参与这些修饰过程的酶的小分子抑制剂或增强剂来实现。在癌症治疗领域, 通过研究与Khib相关的酶的抑制剂, 可以尝试干预肿瘤细胞的干性与侵袭, 从而为癌症治疗提供新的靶点和策略。目前小分子干预翻译后修饰已有成功的先例, 如HDAC抑制剂。但小分子能否特异性干预Khib目前有待研究。某些情况下, 靶向仅作用于Khib的“写入者”和“去除者”或许使特异调控Khib成为可能, 例如在小鼠胚胎肾脏细胞核中SIRT3不充当HDAC, 仅对组蛋白的赖氨酸残基发挥去除Khib活性。

鉴于Khib蛋白显著富集于神经退行性疾病通路, 针对Khib酶的小分子抑制剂或增强剂也可能具有潜在的治疗应用, 从而延缓疾病的进展和发展。

虽然Khib在肿瘤中的研究相对较少, 但我们预

期这将是—个极富潜力的领域。肿瘤细胞通过改变代谢途径来适应肿瘤微环境, 代谢调控也影响免疫细胞的功能。尽管目前还没有直接证据显示 Khib 与肿瘤免疫调控之间的联系, 但同为  $\alpha$ -羟基酸的乳酸已被证明其通过 PTM 和自身的酸性特性, 对肿瘤免疫微环境有着显著的影响。而肠道菌群产生的乙酸、丙酸和丁酸等也是调控肿瘤免疫微环境重要因子。Khib 对肿瘤细胞和免疫细胞分别有何种作用, 又如何影响细胞间的互作, 以上因素与氧化应激又有何种关系, 均是值得研究的。

### 参考文献 (References)

- [1] KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function [J]. Cell, 2007, 128(4): 693-705.
- [2] VERDIN E, OTT M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(4): 258-64.
- [3] FU J, WU M, LIU X. Proteomic approaches beyond expression profiling and PTM analysis [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(17): 4051-60.
- [4] HUANG H, SABARI B R, GARCIA B A, et al. SnapShot: histone modifications [J]. Cell, 2014, 159(2): 458.
- [5] DUTTA A, ABMAYR S M, WORKMAN J L. Diverse activities of histone acylations connect metabolism to chromatin function [J]. Mol Cell, 2016, 63(4): 547-52.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] THOMAS M, MAKEH I, BRIAND P, et al. Determinants of the brain-specific expression of the rat aldolase C gene: *ex vivo* and *in vivo* analysis [J]. Eur J Biochem, 1993, 218(1): 143-51.
- [12] XIE Z, DAI J, DAI L, et al. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones [J]. Mol Cell Proteomics, 2012, 11(5): 100-7.
- [13] HUANG H, TANG S, JI M, et al. p300-mediated lysine 2-hydroxyisobutyrylation regulates glycolysis [J]. Mol Cell, 2018, 70(4): 663-78.
- [14] LIAO L, HE Y, LI S J, et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation of NAT10 promotes cancer metastasis in an ac4C-dependent manner [J]. Cell Res, 2023, 33(5): 355-71.
- [15] LU Y, LI X, ZHAO K, et al. Global landscape of 2-hydroxyisobutyrylation in human pancreatic cancer [J]. Front Oncol, 2022, 12: 1001807.
- [16] 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.
- [17] WANG N, JIANG Y, PENG P, et al. Quantitative proteomics reveals the role of lysine 2-hydroxyisobutyrylation pathway mediated by Tip60 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4571319.
- [18] WEI M, LI J, YAN H, et al. Physiological ovarian aging is associated with altered expression of post-translational modifications in mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 2.
- [19] XIE T, DONG J, ZHOU X, et al. Proteomics analysis of lysine crotonylation and 2-hydroxyisobutyrylation reveals significant features of systemic lupus erythematosus [J]. Clin Rheumatol, 2022, 41(12): 3851-8.
- [20] YANG D, LI X, YU B, et al. Qualitative lysine crotonylation and 2-hydroxyisobutyrylation analysis in the ovarian tissue proteome of piglets [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1176212.
- [21] YUAN Y, YUAN H F, GENG Y, et al. Aspirin modulates 2-hydroxyisobutyrylation of ENO1K281 to attenuate the glycolysis and proliferation of hepatoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 560: 172-8.
- [22] 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.
- [23] ZHU W, JIANG X, SUN H, et al. Global lysine acetylation and 2-hydroxyisobutyrylation profiling reveals the metabolism conversion mechanism in *Giardia lamblia* [J]. Mol Cell Proteomics, 2021, 20: 100043.
- [24] HUANG S, TANG D, DAI Y. Metabolic functions of lysine 2-hydroxyisobutyrylation [J]. Cureus, 2020, 12(8): e9651.
- [25] LI M, WANG B, ZHANG M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(6): 2117-22.
- [26] BOUATRA S, AZIAT F, MANDAL R, et al. The human urine metabolome [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73076.
- [27] PSYCHOGIOS N, HAU D D, PENG J, et al. The human serum metabolome [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16957.
- [28] GUNERAL F, BACHMANN C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population [J]. Clin Chem, 1994, 40(6): 862-6.
- [29] HOFFMANN G F, MEIER-AUGENSTEIN W, STOCKLER S, et al. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid [J]. J Inher Metab Dis, 1993, 16(4): 648-69.
- [30] HUSEK P, SVAGERA Z, HANZLIKOVÁ D, et al. Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by *in-situ* heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2016, 1443: 211-32.
- [31] PSYCHOGIOS N, HAU D D, PENG J, et al. The human serum metabolome [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16957.
- [32] CALVANI R, MICCHELI A, CAPUANI G, et al. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabolite type [J]. Int J Obes, 2010, 34(6): 1095-8.
- [33] LI M, WANG B, ZHANG M, et al. Symbiotic gut microbes mod-

- ulate human metabolic phenotypes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2117-22.
- [34] DONG H, GUO Z, FENG W, et al. Systematic identification of lysine 2-hydroxyisobutyrylated proteins in *Proteus mirabilis* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(3): 482-94.
- [35] KLUPCZYNSKA A, SWIATLY A, HAJDUK J, et al. Identification of serum peptidome signatures of non-small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 410.
- [36] WANG H, ZHANG H, DENG P, et al. Tissue metabolic profiling of human gastric cancer assessed by  $^1\text{H}$  NMR [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 371.
- [37] CHAUDHARI U, ELLIS J K, WAGH V, et al. Metabolite signatures of doxorubicin induced toxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(12): 1955-63.
- [38] KOLESNIKOV A V, KOZYR A V, SCHEMYAKIN I G, et al. Contemporary conception of immune response activation mechanism by conjugated polysaccharide vaccines [J]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2015(3): 97-106.
- [39] STOLYAROV I D, PETROV A M, SHKILNYUK G G, et al. Capabilities of positron emission tomography to study mechanisms of multiple sclerosis: own data and literature [J]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2016, 116(2 Pt 2): 27-31.
- [40] 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.
- [41] DONG H, ZHAO Y, BI C, et al. TmcA functions as a lysine 2-hydroxyisobutyryltransferase to regulate transcription [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(2): 142-51.
- [42] REN J, SANG Y, LU J, et al. Protein acetylation and its role in bacterial virulence [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(9): 768-79.
- [43] REN J, SANG Y, QIN R, et al. Metabolic intermediate acetyl phosphate modulates bacterial virulence via acetylation [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 55-69.
- [44] ROTHFORK J M, TIMMINS G S, HARRIS M N, et al. Inactivation of a bacterial virulence pheromone by phagocyte-derived oxidants: new role for the NADPH oxidase in host defense [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(38): 13867-72.
- [45] DONG H, ZHAI G, CHEN C, et al. Protein lysine de-2-hydroxyisobutyrylation by CobB in prokaryotes [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaaw6703.
- [46] 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.
- [47] ZHAO S, ZHANG X, LI H. Beyond histone acetylation-writing and erasing histone acylations [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, 53: 169-77.
- [48] ZHANG Z, WANG Y, LIANG Z, et al. Modification of lysine-260 2-hydroxyisobutyrylation destabilizes ALDH1A1 expression to regulate bladder cancer progression [J]. *iScience*, 2023, 26(11): 108142.
- [49] TANG D, CHEN M, HUANG X, et al. SRplot: a free online platform for data visualization and graphing [J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0294236.
- [50] CHENG A, GRANT C E, NOBLE W S, et al. MoMo: discovery of statistically significant post-translational modification motifs [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(16): 2774-82.
- [51] SHERMAN B T, HAO M, QIU J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W21.
- [52] TANG D, CHEN M, HUANG X, et al. SRplot: a free online platform for data visualization and graphing [J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0294236.