



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Activity-based proteasome profiling

Li, N.

Citation

Li, N. (2016, December 16). *Activity-based proteasome profiling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22870>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22870>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22870> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Li, Nan

Title: Activity-based proteasome profiling

Issue Date: 2013-12-16

蛋白酶体活性表达谱

本书主要讨论了研究泛素-蛋白酶体系统的化学生物学方法。

第一章简要概括了泛素-蛋白酶体系统的生物学功能和蛋白酶体活性表达谱方法。泛素-蛋白酶体系统是真核细胞中最重要的蛋白质代谢机制。其中泛素是用于标记细胞内需要被降解的蛋白质；而蛋白酶体则通过识别蛋白上的泛素，对蛋白质进行有规则的水解。真核细胞内大部分的蛋白质都可以被该系统降解成多肽，进而被各种氨肽酶分解成氨基酸而用于新蛋白质的合成。基于该系统的重要作用，蛋白酶体已经被开发成用于治疗诸如癌症和自身免疫等疾病的药物靶点。因此，研究对蛋白酶体活性进行检测的方法已经成为临床和基础研究中的重要议题。

第二章是一篇关于最近几年内蛋白质活性表达谱 (ABPP) 方法在生物医学及相关学科中应用的文献综述。蛋白质活性表达谱是一种用于直接检测有活性的酶在细胞或其他生物体系中存在量的功能蛋白质组学方法。它是化学生物学发展最重要的驱动力之一，也是有机化学对于生物学研究贡献最明显的领域。这项技术是基于抑制物的反应活性基团与酶活性位点进行不可逆的共价结合，利用事先修饰在抑制物上的荧光基团或亲和标记物对被目标酶进行标记或者亲和纯化。近几年，蛋白质活性表达谱研究从比较易于标记的目标酶 (比如丝氨酸水解酶，半胱氨酸和苏氨酸蛋白水解酶) 向更加难以标记的目标酶转移。这些较难标记的目标酶包括在生物体中存在丰度比较低的酶、活性中心不是亲核氨基酸残基的酶以及底物比较特殊的酶。同时，蛋白质活性表达谱已经对临床医学研究产生了明显的推动作用。

第三章介绍了一个已经建立完善的用于相对定量检测蛋白酶体活性的方法。一方面，可以利用特异识别蛋白酶体亚基的小分子荧光探针 (ABP) 对活细胞中有活性的蛋白酶体进行定量检测，进而测定被蛋白酶体抑制物硼替佐米处理过的细胞中残留的蛋白酶体活性的比例。另一方面，可以利用生物素修饰的小分子探针标记细胞蛋白提取液中的蛋白酶体活性亚基并进行亲和纯化。而对于活细胞内的蛋白酶体，可以利用一个易于穿过细胞膜的叠氮探针进行标记，在提取细胞蛋白以后，再通过生物正交化学的方法将生物素偶联到探针上，并进行亲和纯化。然后利用高效液相色谱质谱联用技术 (LC-MS) 准确地对富集的蛋白酶体亚基的活性位点进行鉴定。同时，通过稳定同位素标记的方法，可以在同一个实验中对蛋白酶体的所有活性亚基进行相对定量。

第四章是关于生物正交化学在蛋白酶体活性表达谱实验中应用的方法介绍。由于在某些情况下，标签基团（如荧光基团或生物素）会影响小分子探针的活性、选择性或细胞渗透性等性质，限制了探针的应用。我们用生物正交反应基团在探针分子中代替标签基团，在对酶进行第一步活性标记以后，通过生物正交反应加装标记物，这种方法也被称作两步法蛋白质活性表达谱。叠氮作为一种重要的生物正交官能团被广泛的应用在两步法之中。通过这个章节，我们比较了铜催化 Huisgen 叠氮-炔环加成和 Staudinger-Bertozzi 这两种生物正交反应，在蛋白变性和未变性两种条件下对不同位置叠氮的标记效率。

第五章主要介绍了用定量蛋白酶体活性表达谱（第三章）和定量蛋白质组学相结合的方法对骨髓瘤细胞形成硼替佐米抗药性分子机制进行的探索。从 2003 年开始硼替佐米被应用于多发性骨髓瘤临床治疗并在疗效上取得了巨大的成功。但是另一方面在大量病人接受治疗的过程中，体内的癌细胞也对硼替佐米产生了抗药性。所以发现并解释骨髓瘤细胞产生硼替佐米抗药性的分子机理变得十分重要。我们发现在我们所研究的骨髓瘤细胞的抗药性形成机制是复杂的细胞通路间此消彼长的相互作用，而不是简单的靶基因突变。

第六章介绍了利用蛋白酶体活性表达谱方法研究一种最近发现的蛋白酶体亚基的工作。2007 年日本科学家在小鼠的胸腺中发现了一种新的 20S 蛋白酶体，在这种蛋白酶体中，免疫蛋白酶体亚基 $\beta 5i$ 被一个新亚基替代。这个新的亚基被命名为 $\beta 5t$ （ t 代表胸腺），而这种新发现的蛋白酶体被命名为胸腺蛋白酶体。随后他们又发现胸腺蛋白酶体对于 $CD8^+$ T 淋巴细胞的阳性选择具有重要作用。这个章节揭示了 $\beta 5t$ 是具备蛋白水解活性的，而且它的蛋白水解活性与其他两个同源的蛋白水解酶 $\beta 5$ 和 $\beta 5i$ 有所不同。 $\beta 5t$ 更倾向于水解那些包含较多亲水氨基酸的多肽序列。

第七章描述了对于 O-GlcNAc 糖基化修饰和泛素化蛋白转运子 hHR23B 功能之间关系的研究。O-GlcNAc 糖基化是一种广泛存在于高等真核生物细胞核与细胞质中的蛋白质翻译后修饰。与多数糖基化修饰不同，O-GlcNAc 为单糖修饰，而且比较活跃不稳定。在这一点上它的性质与磷酸化更相似。另一方面由于 O-GlcNAc 也修饰在蛋白质裸露的丝氨酸和苏氨酸残基上，它有时也与磷酸化表现出一种竞争性的关系。我们利用一系列化学生物学方法证明了 hHR23B 上确实存在 O-GlcNAc 修饰。同时实验结果也表明通过这些糖基化修饰，hHR23B 的构型可能会发生变化，从而影响它与其他蛋白之间的相互作用和它的功能。

第八章对整本论文的实验工作进行了归纳和总结，并对未来的研究工作进行了展望。