

化学生物学解析疾病中 O-GlcNAc 糖基化功能: 研究工具与策略

张娜娜 于恺然 李际婷 张嘉宁 刘宇博*

(大连理工大学 生命科学与药学院 盘锦 122406)

摘要 O-连接 β -N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化是广泛存在于蛋白质丝/苏氨酸残基的翻译后修饰。这一动态、可逆单糖修饰以位点特异性方式影响底物蛋白的结构和生物学功能,参与调控几乎所有细胞生理过程和重大疾病的演进过程。随着研究深入, O-GlcNAc 糖基化生物功能的系统解析需要更多特异、精准的研究工具和糖蛋白质组学研究策略。近年来,化学生物学领域开发了包括小分子糖探针、生物正交糖代谢标记物、化学酶法、特异性抗体和凝集素等多种 O-GlcNAc 糖基化分析工具和方法,以此为基础进一步发展了 O-GlcNAc 糖蛋白质组学研究策略。同时,借助高分辨质谱,大量蛋白质 O-GlcNAc 修饰位点得以鉴定,极大促进了位点特异性 O-GlcNAc 的生物功能研究。本文综述了近年来这一领域的研究进展,以期为更多化学工具的开发提供依据,为揭示 O-GlcNAc 糖基化在疾病演进中的功能提供新的研究思路和策略。

关键词 O-GlcNAc 糖基化; 化学生物学; 分子工具; 糖蛋白质组学

Application of Chemical Biology to Reveal the Function of O-GlcNAcylation in Diseases: Research Tools and Tactics

Zhang, Nana Yu, Kairan Li, Jiting Zhang, Jianing Liu, Yubo*

(School of Life and Pharmaceutical Sciences, Dalian University of Technology, Panjin 122406, China)

Abstract The addition of O-linked- β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) onto serine and threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins is an abundant and unique post-translational modification that plays a critical role in governing important biological processes. Since its discovery, O-GlcNAcylation has been shown to contribute to numerous cellular processes, including signaling, protein localization and stability, transcription, chromatin remodeling, mitochondrial function, and cell survival. O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible post-translational modification that regulates protein function in a site-specific manner, making it an important player in the regulation of diverse biological processes. Dysregulation of O-GlcNAcylation has been implicated in the pathogenesis of various diseases, including cancer, neurodegenerative disorders, and diabetes. To better understand the regulatory roles of O-GlcNAcylation in cellular physiology and disease pathogenesis, O-GlcNAc proteomics strategies and more specialized, more exact research tools are needed to further explore the bio-functional systematization of O-GlcNAcylation. In recent years, the field of chemical biology has developed various tools and methods for analyzing O-GlcNAc glycosylation, including small molecule sugar probes, metabolic labeling reagents, chemoenzymatic techniques, specific antibodies, and lectins. These tools have served as a foundation for the further development of O-GlcNAc glycoproteomic research strategies. O-GlcNAc glycoproteomic strategies, such as high-resolution mass spectrometry-based approaches have been developed to allow for the detection and quantification of O-GlcNAc modifications on specific proteins, enabling site-specific analysis of O-GlcNAc modification patterns. The number of proteins modified by O-GlcNAc is quite extensive, with at least 7000 modification sites identified in human cells. This highlights the importance of O-GlcNAcylation in regulating diverse biological processes. Identification of O-GlcNAcylation sites with specific biological functions is still a remaining problem. Innovative solutions are required to address this challenge in cell models and disease therapy. At the same time, with the aid of high-resolution mass spectrometry, a large number of O-GlcNAc modification sites on proteins have been identified, which has greatly promoted the study of site-specific O-GlcNAc biological functions. This article has reviewed the recent advances in the field of O-GlcNAc research, with the aim of providing a basis for the development of more chemical tools and offering new research ideas and strategies for uncovering the functions of O-GlcNAcylation in disease progression.

Keywords O-GlcNAcylation; chemical biology; molecular tools; glycoproteomics

1 引言

O-连接 β -N-乙酰葡萄糖胺(O-GlcNAc)糖基化是广泛

发生在胞质和核蛋白丝/苏氨酸残基上的氧连接单糖修饰,分别由对应的糖基转移酶 OGT 和糖苷酶 OGA 催化

* E-mail: liuyubo@dlut.edu.cn

Received February 19, 2023; published June 7, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21975163, 32171282).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21975163, 32171282)资助。

修饰和水解过程. 尿苷二磷酸乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc) 作为这一高度动态、可逆修饰过程的底物糖供体, 在胞内由葡萄糖通过己糖胺合成途径合成. 胞内存在数以千计的 O-GlcNAc 糖基化蛋白. 这些蛋白分布广泛, 在细胞核、细胞质, 以及线粒体^[1]和溶酶体^[2]等亚细胞结构中均有报道. O-GlcNAc 修饰对底物蛋白质的蛋白-蛋白相互作用、稳定性和表达水平、酶催化活性等生物学活性产生影响, 参与调控诸如信号传导、细胞周期和基因转录等重要生物学过程^[3](图 1). 细胞可通过迅速调整众多关键酶和信号分子的 O-GlcNAc 糖基化水平, 改变底物蛋白活性和生物学功能, 以响应环境变化和信号刺激, 证明 O-GlcNAc 糖基化具有细胞营养、应激和代谢的“信号感受器”功能. O-GlcNAc 糖基化异常已被明确与糖尿病^[4-5]、神经退行性疾病^[6-7]和癌症^[8-14]等重大疾病演进过程密切相关. 其中, 病理性高血糖激活的己糖胺合成途径, 导致 UDP-GlcNAc 合成增加和组织异常的 O-GlcNAc 水平; 在阿尔兹海默症中, 包括 TAU 蛋白、神经丝、 β -淀粉样前体蛋白和突触核蛋白均存在异常的 O-GlcNAc 修饰; 而在癌症演进中, 研究表明 O-GlcNAc 糖基化升高有助于肿瘤细胞的增殖和侵袭过程^[15]. 然而, 由于 O-GlcNAc 糖基化底物众多、特异性检测困难, 使得其调控疾病发生发展的精确机制至今尚未阐明. 近年来, 化学生物学方法在 O-GlcNAc 糖基化研究中的应用取得了快速进展. 研究人员已经开发出新的分子工具和组学分析策略, 为克服这一领域的挑战提供了新的研究路径. 本文综述并讨论了近年来该领域的研究进展, 旨在为更全面、系统研究 O-GlcNAc 糖基化在疾病演进中的功能提供新方法, 为人类疾病的诊断和治疗提供新思路.

2 化学小分子 O-GlcNAc 糖探针

研究表明, O-GlcNAc 糖基化是维持生命稳态的必要条件, 基因敲除 OGT 与 OGA 将在细胞和胚胎层面致

死^[16-17]. 越来越多的研究表明, OGT 和 O-GlcNAc 的水平在前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中上调, 抑制肿瘤细胞中的 O-GlcNAc 修饰可以抑制肿瘤的发生^[18]. 因此, 开发小分子抑制剂和激动剂类 O-GlcNAc 糖探针可用于胞内整体水平 O-GlcNAc 糖基化的生物学功能的研究, 并可能进一步用于相关疾病治疗. 同时, 这些化学工具还将为 O-GlcNAc 糖蛋白作为新的疾病治疗靶点提供重要依据^[19].

2.1 OGT 抑制剂类 O-GlcNAc 糖探针

人源 OGT 分为三个亚型, 即核质或全长 OGT(ncOGT)、线粒体 OGT(mOGT) 和短亚型 OGT(sOGT). 三种 OGT 亚型由同一基因编码, 由 N 端四肽重复结构域(TPR)和 C 端保守催化结构域组成. 目前已有多种针对催化结构域的 OGT 小分子抑制剂糖探针用于 O-GlcNAc 糖基化参与疾病进展的功能研究^[20](图 2).

四氧嘧啶(Alloxan)是第一个被报道的 OGT 小分子抑制剂糖探针^[21], Alloxan 的化学结构与 UDP-GlcNAc 中的 UDP 部分近似, 具有较好的细胞渗透性, 是糖供体底物类似物. Konrad 等使用 Alloxan 研究了 O-GlcNAc 修饰在缺血性预处理中的心脏保护作用, 但由于 Alloxan 对 OGT 选择性差, 因此未能完全阻断 O-GlcNAc 的保护功能^[22]. 此外, Alloxan 在使用过程中导致脱靶效应和较强细胞毒性, 甚至有文献报道其对 OGA 的酶活抑制能力超过对 OGT 的抑制能力^[23]. 针对这一问题, 特异性抑制 OGT 活性成为后续 O-GlcNAc 探针开发的重点. Gloster 等合成了 OGT 选择性抑制剂 UDP-5SGlcNAc 和 Ac-5SGlcNAc^[24], 通过模拟天然底物 UDP-GlcNAc 的结构, 抑制 OGT 酶活性. 其中, UDP-5SGlcNAc 缺乏细胞渗透性, 不能直接作为活细胞 O-GlcNAc 糖探针. Ac-5SGlcNAc 则因良好的细胞透过性, 在胞内展现出良好的 O-GlcNAc 糖基化抑制效果. Ac-5SGlcNAc

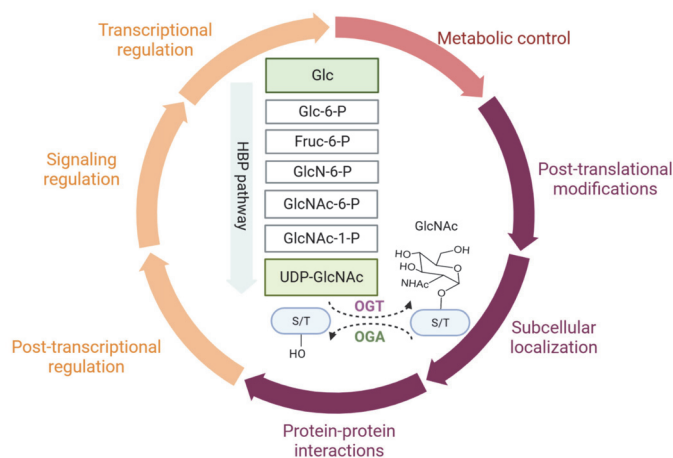


图 1 O-GlcNAc 糖基化调控多种细胞功能和生理过程. S: 丝氨酸; T: 苏氨酸. HBP: 己糖胺合成途径

Figure 1 O-GlcNAcylation regulates various cellular functions and physiological processes. S: serine; T: threonine. HBP: hexosamine biosynthetic pathway

能够通过降低 O-GlcNAc 修饰, 调节乳腺癌细胞的脂质代谢, 减少乳腺癌细胞的细胞活性^[25]. Ac-5SGlcNAc 在胰腺癌中通过降低 O-GlcNAc 修饰, 影响肿瘤细胞的增殖速率^[10]. 为了进一步在体内抑制 OGT 活性, 研究者开发了具有更高水溶性、更强细胞渗透力以及含有疏水 N-酰基取代基的 GlcNAc 类似物 5S-GlcNH₆ ($IC_{50}=11 \mu\text{mol/L}$)^[26]. 该糖探针能够经体内代谢生成与 UDP-5S-GlcNAc 相同的活性化合物, 并在小鼠模型中表现出较好的 OGT 抑制活性. 然而, 这类糖探针在体内通过 HBP 途径代谢, 导致细胞内的 UDP-GlcNAc 合成降低, 这将对其他糖基化修饰过程产生抑制, 从而引发副反应. 此外, Borodkin 等利用 OGT 受体底物肽段 (VTPVSTA) 的丝氨酸与 UDP 共价连接, 获得 OGT 双底物抑制剂 Goblin 1^[23] ($IC_{50}=18 \mu\text{mol/L}$) 和更高效的衍生物 S-linked goblin 1^[27] ($IC_{50}=2 \mu\text{mol/L}$). 由于该类糖探针的 UDP 磷酸二酯团带有负电荷, 导致其不能渗透进入细胞, 因此其在体内应用受限.

近年来, 通过化合物库筛选^[28]或理性设计, 研究者开发了多种 IC_{50} 在微摩尔级别的膜透过性 OGT 抑制分子探针. 其中, 通过高通量筛选获得的具有体外抑制 OGT 活性的探针分子, 包括 Benzoxazolinone (BZX, $IC_{50}=10 \mu\text{mol/L}$) 和 Quinolinone-6-sulfonamide (Q6S). 进一步基于结构的优化, 分别得到了更有效的 BZX2 分子 ($IC_{50}<10 \mu\text{mol/L}$)^[29] 和 OSMI-1 ($IC_{50}=2.7 \mu\text{mol/L}$)^[30]. Rahman 小组分别用 OGT 抑制分子 (Alloxan, BZX2 和 OSMI-1) 处理皮质神经元, 研究了 O-GlcNAc 修饰在调节自噬途径中的作用^[31]. 本课题组在前期的研究中发现, 使用 OSMI-1 可以减轻化疗耐药肿瘤细胞对药物的耐受性^[32]. 此外, OSMI-1 通过抑制 NF- κ B 的 O-GlcNAc 修饰, 能够阻断下游信号传导和内质网应激反应, 诱导

人结肠癌和肝癌细胞的凋亡^[33-34]. OSMI-1 还能促进造血干/祖细胞分化为红系祖细胞, 这对于理解红细胞生成和血液系统疾病至关重要^[35]. 由于 OSMI-1 脱靶效应对细胞活力产生多种影响, Martin 团队进一步合成了 OSMI 系列探针分子: OSMI-2, OSMI-3, OSMI-4. 其中 OSMI-4 ($IC_{50}=60 \text{ nmol/L}$)^[36] 是迄今体外 OGT 抑制活性最高的化合物. Liu 等^[37] 已成功利用 OSMI-4 诱导神经干细胞向神经元分化, 提示 OSMI-4 可能被用于脊髓损伤治疗.

Wang 等^[38] 基于捆绑式原位点击化学法开发了两种可透过细胞的 O-GlcNAc 糖基化抑制分子 APNT ($IC_{50}=66.7 \mu\text{mol/L}$)、APBT ($IC_{50}=139 \mu\text{mol/L}$). 与大多数已报道的探针分子不同, APNT 和 APBT 是 OGT 非竞争性抑制剂. 本课题组前期通过基于结构的虚拟筛选发现了第一个天然化合物类 OGT 特异性抑制分子四氢穗花杉双黄酮^[39] (L01 $IC_{50}=21.8 \mu\text{mol/L}$), 其细胞透过性好, 在细胞和动物模型上均表现出低毒性特征. 后续, 通过类似方法获得了阿曼托双黄酮 (AF $IC_{50}=48.1 \mu\text{mol/L}$)^[40a]、3,8'-联苻菜昔元 (L38 $IC_{50}=12.88 \mu\text{mol/L}$)^[40b] 等多个双黄酮类天然产物探针分子. 在乳腺癌细胞中, L01 通过抑制胞内蛋白的 O-GlcNAc 修饰, 降低了上皮-间质转化途径中间质标志物表达水平, 证明 O-GlcNAc 糖基化参与乳腺癌细胞转移潜能调控^[41]. 在肝癌细胞中, L01 通过下调胞内的 O-GlcNAc 修饰水平, 在显著上调转录因子 FOXA2 表达的同时, 抑制肝癌细胞的迁移侵袭潜能^[42]. 近期, Albuquerque 小组^[43] 开发出一系列新的拟肽 OGT 抑制剂, 其中 LQMed 330 抑制效果较好, 其 IC_{50} 为 $11.7 \mu\text{mol/L}$, 为 OGT 抑制剂类 O-GlcNAc 糖探针开发提供了新思路.

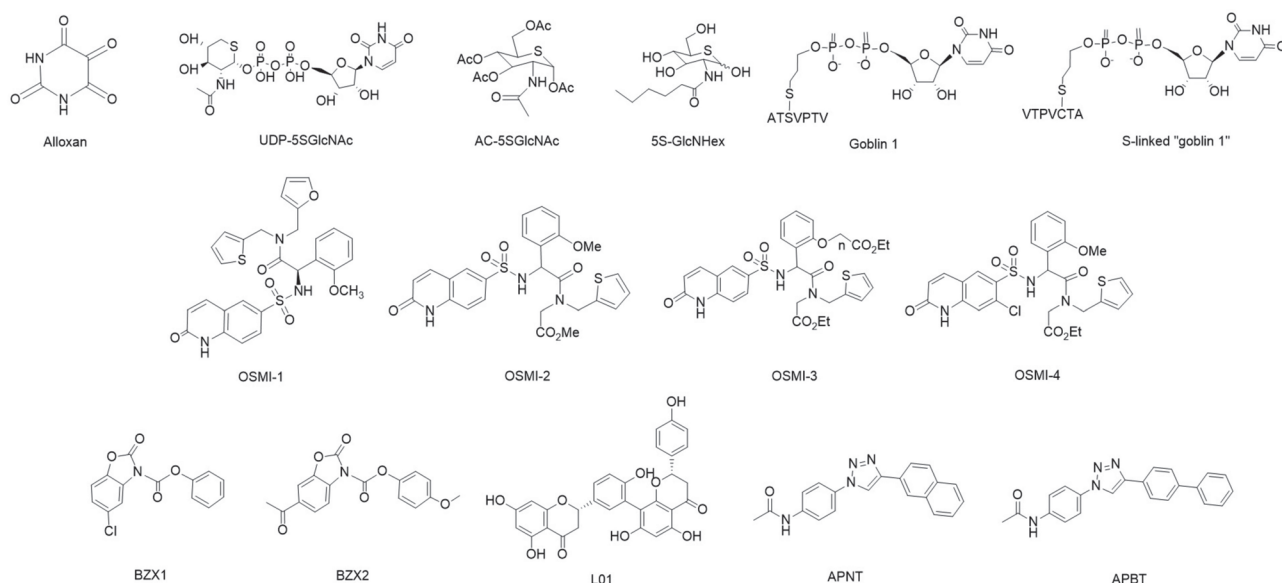


图 2 OGT 抑制剂类 O-GlcNAc 糖探针化学结构. (a) UDP 以及 UDP-GlcNAc 类似物 O-GlcNAc 糖探针. (b) 高通量筛选获得的 O-GlcNAc 糖探针
Figure 2 Chemical structures of OGT inhibitor-related O-GlcNAc molecular probes. (a) UDP and UDP-GlcNAc analog O-GlcNAc molecular probes. (b) O-GlcNAc molecular probes obtained by high-throughput screening

这些糖探针不仅为发展新型高效的 OGT 抑制分子提供了结构信息和新的筛选策略, 也为开发更有效且更适用于体内检测 O-GlcNAc 糖基化功能的特异性糖探针提供研究基础. 这些探针工具分子在活细胞内的 OGT 抑制活性虽已证实, 但在动物模型中的特异性、活性以及毒性仍需要进一步研究(表 1).

2.2 OGA 抑制剂类 O-GlcNAc 探针

OGA 是一种双结构域蛋白, 其 C 端结构域类似于 N-乙酰转移酶的 GCN5 结构, N 端结构域与糖苷水解酶家族 84(GH84)同源, OGA 的 N 端结构域催化水解蛋白质与 O-GlcNAc 基团间的糖苷键. 起初, OGA 抑制分子的开发同样存在选择性问题. 早在 1991 年, Horsch 等就证明了 PugNAc 能在体外有效抑制 OGA 活性, 成为早期广泛使用的强效 OGA 抑制分子($K_i=46$ nmol/L)^[44]. 在肝癌细胞中, 利用 PugNAc 上调胞内整体的 O-GlcNAc 修饰水平, 证实 O-GlcNAc 修饰能够促进肝癌细胞的迁移^[42]. 然而, PugNAc 对 GH20 家族中的溶酶体 β -己糖胺酶的 HEXA 和 HEXB 亚基存在非特异结合, 增加这一探针的脱靶效应风险. 后续开发的 NAG-二氢噻唑(NAG-thiazoline), 被证明能有效地抑制人源 OGA ($K_i=70$ nmol/L). 已有文献利用该分子证明了 O-GlcNAc 糖基化的增加可以为缺血-再灌注损伤提供心脏保护作用^[45]. 然而, 由于 NAG-thiazoline 分子在与 OGA 和溶酶体 β -己糖胺酶结合时具有近似的 K_i 值($K_i=70$ nmol/L), 导致其选择性较差. 基于此, 研究者改进开发了几种衍生物, 通过在噻唑啉环上添加更长的烷基取代基, 使得这些糖探针具有更强的 OGA 选择性, 但 NButGT 等化合物在体内和溶液中均存在稳定性差的问题, 因此对 OGA 抑制效果不高($K_i=230$ nmol/L)^[46].

Macauley 等报道的 6-Acetamido-6-deoxy-castanospermine (6-Ac-Cas, $K_i=300$ nmol/L)具有较好的细胞渗透性, 能够以剂量依赖方式增加胞内 O-GlcNAc 修饰水平, 进而做为探针分子被用于胰岛素抵抗相关研究^[47]. 此后, 更具选择性的 OGA 抑制分子陆续面世. Dorfmueller 等^[48]基于 OGA 和 PugNAc 共结晶结构开发

了葡萄糖咪唑衍生物 GlcNAcstatin ($K_i=3.2$ nmol/L). 研究者也进一步对 NButGT 进行修饰改造, 将烷基链的近端亚甲基替换为胺基, 以增加静电相互作用, 获得了高效的抑制分子 Thiamet-G ($K_i=2.1$ nmol/L), 具有优秀的 OGA 选择性(β -己糖胺酶的 35000 倍). 此后, 由于 Thiamet-G 具有化学合成简易、细胞内稳定性强、渗透性好及可跨越血脑屏障的优点, 使其成为众多体外和体内研究中优先选择的 OGA 抑制剂类糖探针. 研究表明, Thiamet-G 通过增加大鼠脑皮层和海马区 TAU 蛋白的 O-GlcNAc 糖基化抑制其 Thr231、Ser396 和 Ser422 位的磷酸化, 抵消 TNF- α 诱导的血管功能障碍, 提示 O-GlcNAc 糖基化异常与阿尔兹海默症密切相关^[49-50]. Thiamet-G 被用于阿尔茨海默病小鼠模型中增加 O-GlcNAc 修饰水平, 阻碍蛋白质聚集并减少神经变性. 在胰腺癌移植瘤模型中, Zhu 等^[51]使用 Thiamet-G 证实了苹果酸脱氢酶 1 (MDH1)的 O-GlcNAc 修饰能够促进胰腺癌细胞增殖和动物模型中肿瘤的生长. MK-8719 是基于 Thiamet-G 开发的 OGA 抑制分子, 同样具有高选择性和良好的中枢神经系统渗透性, 被用于 TAU 蛋白异常糖基化介导的神经疾病的临床试验^[52]. Yang 等使用几种 OGA 的抑制剂糖探针分子(Thiamet-G, 6-Ac-Cas, PugNAc)在巨噬细胞中证明 O-GlcNAc 糖基化具有促炎信号抑制作用^[53]. Martínez 等基于一种具有二氮杂螺环酮骨架的高通量筛选试验结果进行深入探索, 发展出了一系列螺环式 OGA 抑制剂^[54]. 在这个系列的分子中, Compound (+)-56 在培养细胞中显示出对 OGA 较好的抑制作用($IC_{50}=17$ nmol/L). 尽管这一分子在体外具有良好的抑制作用和代谢稳定性, 但其欠佳的药代动力学性质阻止了其进一步应用. 近期 González-Cuesta 等^[55]基于 6-Ac-Cas、Thiamet-G 和 MK-8719 结构, 通过理性设计, 得到具有脑渗透性的 DNJC-噻唑烷(DNJC-thiazolidines)分子, 表现出极好的 OGA 选择性($K_i=220$ pmol/L), 已被用于评估 O-GlcNAc 糖基化在动物模型中的神经保护作用. 在 OGA 抑制剂类 O-GlcNAc 探针的研究中, OGA 可能成为 TAU 异常相关神经系统疾病的潜在靶点(图 3).

表 1 OGT 抑制剂类 O-GlcNAc 糖探针及特性

Table 1 Characteristics of OGT inhibitor-related O-GlcNAcylation molecular probes

OGT 抑制剂	抑制性参数	优点	缺点
Alloxan	$IC_{50}=100$ μ mol/L	细胞渗透性好	选择性差
Ac-5SGlcNAc	$EC_{50}=5$ μ mol/L	选择性高	脱靶, 水溶性差
5SGlcNAc	与 Ac-5SGlcNAc 近似	选择性好, 细胞渗透性好	未知
5S-GlcNH ₂	$IC_{50}=11$ μ mol/L	水溶性、细胞渗透力强	同时抑制其它糖基转移酶
Goblin	$IC_{50}=18$ μ mol/L	—	细胞渗透性差, 无法体内实验
OSMI-1	$IC_{50}=2.7$ μ mol/L	细胞渗透性、选择性好	降低细胞活力, 脱靶效应
OSMI-2, OSMI-3, OSMI-4	OSMI-2 $IC_{50}=140$ nmol/L OSMI-3 $IC_{50}=5$ nmol/L OSMI-4 $IC_{50}=8$ nmol/L	抑制效果好	未知
L01	$IC_{50}=21.8$ μ mol/L	细胞可渗透, 天然产物, 低毒性	脱靶效应
APNT, APBT	APNT: $IC_{50}=66.7$ μ mol/L APBT $IC_{50}=139$ μ mol/L	细胞可渗透, 非竞争抑制, 低毒性	水中溶解性差, 效力低
LQMed 330	$IC_{50}=11.7$ μ mol/L	未知	选择性差, 溶解性和渗透性未知

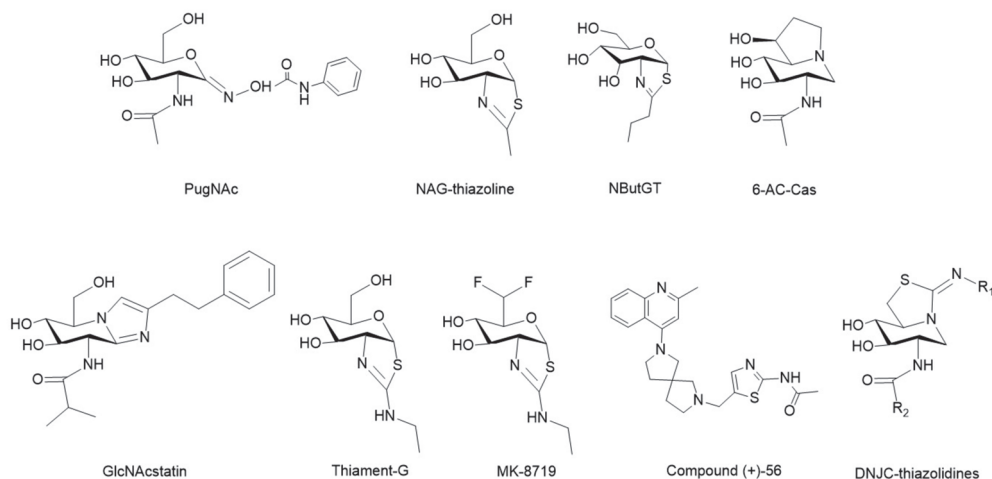


图3 OGA抑制剂类O-GlcNAc糖探针化学结构

Figure 3 Chemical structures of OGT inhibitor-related O-GlcNAcylation molecular probes

3 O-GlcNAc糖基化的检测和化学标记

O-GlcNAc 修饰基团仅为 203.2 Da^[56], 无法在缺少分子级技术或高分辨质谱的情况下被准确检测。同时, 众多胞内 O-GlcNAc 修饰蛋白表达水平变化较大(包括转录因子、蛋白激酶等低丰度蛋白), 且修饰丰度较低(亚化学计量), 导致 O-GlcNAc 的生化检测对灵敏度有较高要求。加之 O-GlcNAc 基团的电中性、质谱中低离子化特征, 且 O-GlcNAc 与丝/苏氨酸的连接化学键在质谱中容易断裂, 增大了质谱检测的难度, 因此开发新的化学工具, 建立特异、灵敏的 O-GlcNAc 修饰检测方法是 O-GlcNAc 修饰研究的关键。迄今为止, O-GlcNAc 糖基化的检测方法除经典的抗体和凝集素免疫印迹法外, 化学生物学工具的开发成为这一领域的研究热点。相关研究主要集中在基于点击化学反应的非天然糖代谢标记和化学酶标记法等生物正交标记技术开发上, 实现了 O-GlcNAc 糖基化的化学标记和成像示踪, 推进了对相关人类疾病发生机制的研究和理解。

3.1 O-GlcNAc糖基化识别抗体和凝集素

目前, 常用于检测蛋白质 O-GlcNAc 糖基化广谱性单克隆抗体是 RL2 和 CTD110.6. RL2 以高度糖基化的核孔蛋白复合物为抗原生产 IgG 抗体^[57]; CTD110.6 则是

IgM 抗体, 可特异性识别与丝/苏氨酸连接的 GlcNAc 基团, 特异性高^[58]。这两种抗体对抗原的肽段序列依赖性小, 因此识别的 O-GlcNAc 糖基化蛋白质种类较多。然而, 后续研究发现 RL2 和 CTD110.6 所识别的 O-GlcNAc 基团受到邻近氨基酸侧链所在空间构象的影响, 导致不能特异性识别所有 O-GlcNAc 糖蛋白。针对这一问题, Abcam 公司以具有三个 O-GlcNAc 修饰且临近均为甘氨酸的肽段连接在钥孔血蓝蛋白 KLH 上做为抗原, 用以提高免疫源性, 获得了新的 O-GlcNAc 糖基化特异性单克隆抗体 EPR19847, 适用于免疫印迹、免疫荧光和免疫沉淀等生化检测方法。此外, 几种 O-GlcNAc 鼠单克隆抗体, 如 HGAC39 和 HGAC85^[59], 10D8^[60] 以及 18B10.C7, 9D1.E4, 1F5.D6^[61] 均使用合成的 O-GlcNAc 糖肽作为抗原产生, 可用于 O-GlcNAc 糖基化检测(表 2)。最近, 一种新的抗体混合物(O-GlcNAc MultiMab Rabbit mAb mix, CST 公司)被开发用于识别 O-GlcNAc 修饰蛋白质。此外, 一些位点特异性抗体相继用于检测, 包括 c-Myc(Thr58)^[62], TAU(Ser400)^[63], 组蛋白 H2A(Ser40, Thr101)^[64] 和 TAB1(Ser395)^[65] 等特定蛋白的 O-GlcNAc 修饰, 在 O-GlcNAc 糖基化参与调控肿瘤演进、神经退行性疾病、干细胞分化、免疫反应等相关研究中发挥重要作用。

表2 代表性 O-GlcNAc 修饰特异性抗体的特性

Table 2 Parameters of several O-GlcNAcylation specific antibodies

O-GlcNAc 抗体	抗原	抗体	应用范围
RL2	CTSPDS (O-GlcNAc) SVIVTLLD	IgG	免疫印迹、免疫荧光、酶联免疫
CTD110.6	VYKSPVVS (O-GlcNAc) GDTSPRH	IgM	免疫印迹、免疫组化
HGAC85	KKFELLPT (O-GlcNAc) PPLSPSRR	IgG	免疫印迹、免疫组化、免疫沉淀、酶联免疫、免疫细胞化学、染色质免疫沉淀
EPR19847	CDTSPAAPVS (O-GlcNAc) YADMRTGI	IgG	免疫印记、免疫沉淀、点杂交

凝集素是一类特异性识别糖类结构的糖蛋白质或糖结合蛋白. 小麦胚芽凝集素(WGA)^[23]对 GlcNAc 和唾液酸具有较高亲和力, 与辣根过氧化物酶及琼脂糖珠偶联后可用作分析和富集 O-GlcNAc 修饰蛋白的有效工具. Fujioka 等开发了 WGA-SDS-PAGE 方法, 含有 WGA 的 O-GlcNAc 亲和凝胶层在电泳过程中使 O-GlcNAc 修饰蛋白的电泳速度减缓, 该 WGA 层由此分离糖基化和未糖基化的蛋白, 实现 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测和定量^[66]. 然而, 由于蛋白质聚糖修饰中存在 GlcNAc 和唾液酸基团, 使得 WGA 在细胞总蛋白中识别 O-GlcNAc 修饰蛋白时存在非特异结合. 进一步研究发现, 琥珀酰化的 WGA (sWGA) 可特异性识别 GlcNAc 残基, 但依然仅能应用于高水平 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测. Soesanto 等^[67]利用 sWGA 研究了 O-GlcNAc 在葡萄糖生理浓度下对肝脏 Akt 信号传导的影响. Diwu 等^[68]则使用 sWGA 富集了阿尔兹海默疾病小鼠模型大脑中的 O-GlcNAc 糖蛋白, 证实 TAU 蛋白的糖基化对阿尔兹海默症的促进作用. 在后续研究中, 研究者们采用凝集素亲和色谱法(LWAC)将凝集素偶联在色谱填料上, 从而更有效地实现 O-GlcNAc 修饰肽段的富集^[69]. 进一步, 将 LWAC 与质谱相结合, 研究者富集和鉴定神经突触蛋白的 O-GlcNAc 修饰肽段和修饰位点, 揭示了 O-GlcNAc 修饰在突触传递中的作用^[70]. 近期, Liu 等^[71]从茶树菇中分离了一种凝集素 AANL(一种真菌凝集素, 能够特异性地结合 GlcNAc 糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD)), 对 O-GlcNAc 糖蛋白表现出高于 WGA 的亲和力. 随后, 通过对 AANL 的 CRD 同质化改造, 获得了 AANL6. 利用 AANL 成功从小鼠肝脏中鉴定到 17 个 O-GlcNAc 修饰蛋白, 使用 AANL6 富集到 54 个 O-GlcNAc 修饰蛋白^[72]. 作者不仅获得了 O-GlcNAc 亲和力和特异性更好的凝集素, 也为 GlcNAc 末端的糖基化修饰研究提供了新的工具. 2012 年 Schimpl 等^[73]发现 CpOGA^{D298N} 对 O-GlcNAc 修饰肽段的亲和力高于人源 OGA, 可达微摩尔级. 2015 年 CpOGA^{D298N} 首次被用作 O-GlcNAc 修饰蛋白的检测^[74]. 2017 年 Selvan 等^[75]首次将 CpOGA^{D298N} 作为 O-GlcNAc 修饰蛋白的富集工具, 富集了 HeLa 细胞系中的 O-GlcNAc 修饰蛋白, 共鉴定到 915 个蛋白序列, 29 个蛋白被鉴定为高置信度的 O-GlcNAc 修饰蛋白. 随后作者将 CpOGA^{D298N} 作为一个底物陷阱, 富集了果蝇胚胎中的 O-GlcNAc 修饰蛋白, 结合蛋白质组学分析, 发现了新的发育调控因子存在 O-GlcNAc 修饰. 进一步, Song 等^[76]发现 OGA^{D298N} 对 O-GlcNAc 表现出了高度的特异性识别能力, 能够有效区分聚糖修饰结构中相似的 GlcNAc 与 GalNAc 基团, 并表现出了优于目前广泛使用的 O-GlcNAc 抗体 CTD110.6 和凝集素的选择性糖蛋白富集能力. 随后作者又将 CpOGA^{D298N} 与邻近连接技术(PLA)相结合, 成功开发获得针对 O-GlcNAc 修饰蛋白的定量分析方法.

虽然抗体和凝集素类检测试剂的种类和应用不断增多, 但这类经典 O-GlcNAc 糖蛋白检测方法的发展和运用仍然面临很多挑战. 首先, 抗体和凝集素识别的 O-GlcNAc 基团和聚糖修饰间可能存在交叉反应^[77], 导致检测假阳性出现; 其次, 抗体和凝集素可能无法有效检测单一修饰、低丰度的 O-GlcNAc 修饰蛋白; 同时, 抗体和凝集素类大分子无法穿透细胞质膜, 限制了其在活细胞内的应用; 抗体和凝集素可能引起动物的免疫反应, 在体内研究中稳定性和生物可用性较低, 导致其在体内被迅速清除, 降低其效力, 这些都限制了其在动物模型中的应用. 而代谢寡糖工程(MOE)可以被活细胞甚至动物接受, 它们被生物合成转化为高能糖供体, 然后通过内源性酶直接掺入聚糖中^[78-79].

3.2 非天然糖代谢标记

为了克服传统抗体和凝集素在检测 O-GlcNAc 修饰蛋白的特异性和效率的限制, 实现对 O-GlcNAc 糖蛋白更广谱和有效的检测示踪, Vocadlo 等^[80]于 2003 年首次将代谢寡糖工程也称为代谢聚糖标记(MGL)方法应用于 O-GlcNAc 修饰的检测. 通过对天然单糖进行化学修饰, 连接叠氮基团, 进而参与胞内的糖供体 UDP-GlcNAc 合成途径. 这种非天然的糖供体随后被 OGT 利用, 将叠氮标记的 O-GlcNAc 基团(O-GlcNAz)连接到 Ser/Thr 残基上, 从而产生带有叠氮的化学标签蛋白, 可通过生物正交反应兼容后续多种检测. 此外, MGL 技术也被应用于 O-GlcNAc 介导的蛋白-蛋白相互作用研究. Yu 等^[81]表达了一种突变形式的 UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶, 并用一种细胞可渗透的、可光交联的二氮杂环修饰 GlcNAc 类似物(GlcNDAz)代谢标记细胞. 利用光激活交联剂使 O-GlcNAc 修饰的蛋白质和邻近分子之间形成共价键, 进一步, 使用质谱鉴定 O-GlcNAc 修饰的蛋白. 针对生物正交基团的探针和检测手段十分丰富, 既可通过 Staudinger ligation 将带有特定标签的探针与标记的葡糖胺类似物连接, 也可通过点击化学反应如铜离子催化的叠氮-炔基环加成反应(CuAAC)和应变促进偶氮-炔基环加成缩合反应(SPAAC)将生物素(Biotin)标签或各种荧光探针连接到葡糖胺类似物上, 化学标记的糖蛋白与荧光和/或生物素化探针之间的后续生物正交反应可实现 O-GlcNAc 修饰蛋白的可视化示踪和/或富集、分离.

N-叠氮乙酰葡萄糖胺(N-azidoacetylglucosamine, GlcNAz)是最早被用于代谢标记的非天然糖, 但 GlcNAz 不仅能够掺入细胞内 O-GlcNAc 修饰蛋白中, 而且还可掺入经典的 N-连接聚糖修饰中^[82]. 此外, 由于 UDP-GlcNAc 可以通过 UDP 半乳糖-4-差向异构酶(GALE)转化为 UDP-GalNAc(反之亦然), 进而导致标记物 GlcNAz 也可掺入粘蛋白型 O-连接聚糖修饰中^[83], 这将进一步影响 O-GlcNAc 代谢标记的特异性和效率. 全乙酰化 Ac₄GlcNAz 相比于 GlcNAz 而言, 具有更高的细

胞摄入效率,进一步被广泛用于后续研究. GlcNAz 和叠氮修饰的 GalNAc 类似物(GalNAz)均可被胞内代谢酶识别,用于底物糖供体的合成,从而通过相应糖基转移酶连接至 O-GlcNAc 或 O-GalNAc 修饰的蛋白上,实现对糖蛋白的选择性标记. 然而,胞内代谢途径转化 GlcNAz 为 UDP-GlcNAz 的效率较低,且糖基转移酶对 UDP-GlcNAz 亦具有较低的利用率,而胞内糖基转移酶更倾向于使用内源性 UDP-GlcNAc 用于底物修饰. 另一方面, GalNAz 则可在胞内被有效地代谢为 UDP-GalNAz,并通过 GALE 的转化作用生成 UDP-GlcNAz,从而具有更高的 O-GlcNAc 代谢标记效率. 因此,Boyce 等^[84]发现全乙酰化的 *N*-叠氮乙酰半乳糖胺(Ac₄GalNAz)同样能借助细胞内一系列酶的作用,生成 UDP-GalNAz 并进一步差向异构化为 UDP-GlcNAz,并且这一非天然糖标记物具有更低的细胞毒性. Xu 等^[85]使用 Ac₄GalNAz 标记肿瘤细胞中的 O-GlcNAc 修饰蛋白,发现 O-GlcNAc 蛋白参与人 T 淋巴细胞病毒 1 型(HTLV-1)感染过程. Zhu 等^[86]则使用 Ac₄GalNAz 代谢标记证实 O-GlcNAc 修饰影响了众多细胞内蛋白的稳定性. 2015 年 Lin 等^[87]通过对细胞内糖蛋白进行双标记,并结合基于荧光寿命的荧光共振能量转移(FRET)成像方法(FLIM-FRET)检测特定蛋白的 O-GlcNAc 修饰及变化. 该方法将目标蛋白融合表达 EGFP 作为 FRET 供体,并利用代谢标记技术和点击化学反应将细胞内所有 O-GlcNAc 修饰蛋白上引入 FRET 受体. 当目标蛋白存在 O-GlcNAc 修饰,在蛋白质分子空间尺寸范围内(通常小于 10 nm),EGFP 与 O-GlcNAc 标记受体之间将发生 FRET 过程. 利用这一技术,研究者直接对细胞内 TAU 蛋白的 O-GlcNAc 修饰状态进行成像观察,深入分析了 TAU 的 O-GlcNAc 修饰在阿尔兹海默症中的作用,为可视化研究 O-GlcNAc 糖基化调节活细胞内蛋白质功能提供了新工具.

进一步的研究表明,全乙酰化非天然糖在胞内与蛋白质的半胱氨酸残基发生非酶标记,产生半缩醛形式的 3-硫代糖基化产物(S-glyco-modification),而不是典型的糖苷. 这种非典型的反应降低了 O-GlcNAc 糖蛋白代谢标记的特异性和有效性,干扰 O-GlcNAc 修饰的蛋白质组学鉴定并导致假阳性结果^[88]. 虽然去乙酰保护的 GalNAz 可以有效避免这种副反应,但 GalNAz 的细胞摄入率低、标记效率差、成本昂贵. 选择性引入酰基保护所发展出的 1,3-二-O-乙酰化 GalNAz(1,3-Ac₂GalNAz)和 1,3-二-O-丙酰化 GalNAz(1,3-Pr₂GalNAz)不仅消除了以上的副反应,并且在多种细胞中呈现出 10~20 倍增强的代谢标记效率^[89],被进一步用于 O-GlcNAc 糖基化调控胚胎发育相关研究. 随后, Qin 等^[90]在此基础上开发了一 1,6-二-O-丙酰化 GalNAz (1,6-Pr₂GalNAz)用于代谢标记研究. 1,6-Pr₂GalNAz 不仅在细胞水平上具有良好的 O-GlcNAc 标记特异性和标记效率,且可有效应用于活体动物的代谢标记.

MatthewR 团队也陆续报道了一系列代谢标记非天然糖分子,包括 GlcNAIk^[91], Ac₃6AzGlcNAc^[92], Ac₃6AlkGlcNAc^[93], Ac₄6AzGlc^[94] 和 1-Hex-GlcNAIk, 1-Hex-6AzGlcNAc^[95]等. 2011 年, Zaro 等^[91]利用炔烃标记的 GlcNAc 类似物 GlcNAIk 与叠氮连接的荧光基团进行点击化学反应,得到与 GlcNAz 近似的代谢标记效率. 通过改进反应条件,研究者进一步富集获得 O-GlcNAc 修饰的泛素连接酶 NEDD4-1. 2014 年,他们证明了 6AzGlcNAc 是一种新的胞内 O-GlcNAc 修饰的特异性代谢标记非天然糖分子. 在此基础上, Lin 等^[96]合成了 Ac₃6AlkGlcNAc 分子,并利用蛋白质组学方法鉴定了多种 O-GlcNAc 修饰的蛋白质. Ac₃6AlkGlcNAc 能够在短至 1 h 内代谢标记胞内蛋白,且在质谱中具有更优的信噪比. 利用其标记小鼠胚胎成纤维细胞,他们首次提供了 O-GlcNAc 修饰在直接抑制半胱天冬酶活化中的潜在作用,并提示半胱天冬酶的 O-GlcNAc 修饰可能在人类发育和疾病中扮演了重要作用. 随后,他们发现使用过乙酰化 Ac₄6AzGlc 处理可以稳定标记多种哺乳动物细胞,且不受谷氨酰胺果糖-6-磷酸氨基转移酶(GFAT, HBP 途径关键酶)敲除的影响,也不会被 OGA 去除. 2021 年, Pedowitz 等针对非天然糖代谢过程中非酶催化反应问题,设计了基于脂肪链修饰的葡萄糖胺衍生物——新型非天然糖分子 1-Hex-GlcNAIk 和 1-Hex-6AzGlcNAc. 这些糖分子既可以高效地跨膜参与代谢标记过程,又可以避免对蛋白半胱氨酸残基的非酶促反应^[95](图 4).

然而,代谢标记法所识别的糖蛋白受到底物蛋白 O-GlcNAc 糖基化更新速率的影响,导致部分稳定存在的 O-GlcNAc 修饰基团标记效率低. 同时,该方法依然无法实现对特定蛋白位点的标记,存在一定的局限性.

3.3 化学酶法标记

O-GlcNAc 糖基化化学酶法标记是利用糖基转移酶向糖蛋白的 O-GlcNAc 基团再额外连接一个带有生物正交基团或报告基团的非天然糖标记物. 由于化学酶法在体外完成,避免了非天然糖标记对细胞正常生理活动的影响. Torres 等^[97]最早采用半乳糖基转移酶(GalT)选择性地向 O-GlcNAc 基团连接同位素标记的半乳糖(Gal). 然而,这一方法的缺点在于野生型 GalT 标记效率很低,且放射性标记成本高、危险性大、操作复杂. 随后, Khidekel 等^[98]基于牛来源的 β -1,4-Gal-T1 酶晶体结构,将 289 位的酪氨酸突变为亮氨酸(Y289L),使得该酶可以容忍并高效利用 UDP-GalNAc. 从而可以将叠氮修饰的 UDP-GalNAz 作为 Gal-T1(Y289L)的糖供体将目的蛋白的 O-GlcNAc 基团进行生物正交标记,随后对目的蛋白进行捕获和检测^[99](图 5). 该方法的应用既可以检测目的蛋白的 O-GlcNAc 修饰情况,也可在组学水平上富集未知的 O-GlcNAc 修饰蛋白. Balana 等^[100]利用 GalT Y289L 标记并富集了非小细胞肺癌细胞中内源性的

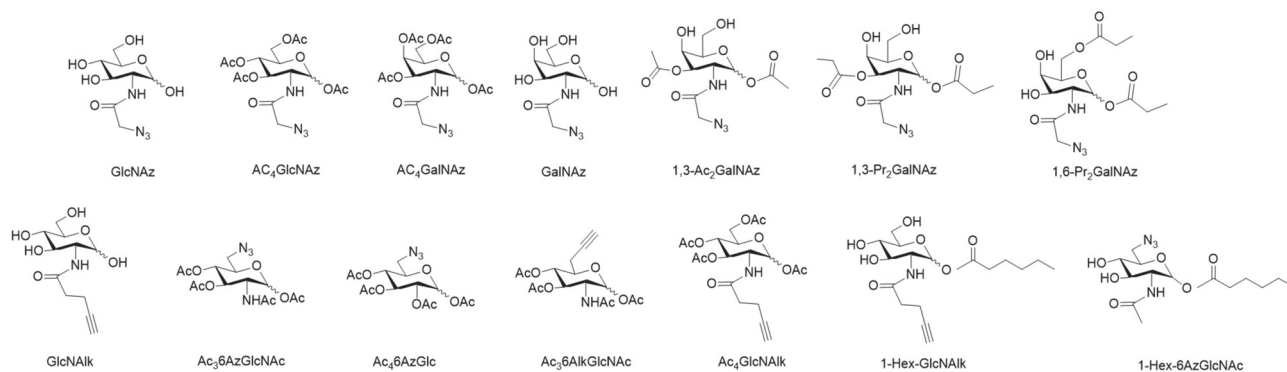


图4 几种代表性的 O-GlcNAc 代谢标记分子化学结构

Figure 4 Chemical structures of several representative O-GlcNAcylation metabolic labeling molecules

O-GlcNAc 修饰蛋白, 证实了 HMGB1 的糖基化位点参与肺癌细胞 DNA 损伤修复过程. 该方法还被应用于高通量鉴定哺乳动物脑组织中功能多样化的 O-GlcNAc 蛋白, 获得了 O-GlcNAc 修饰调节神经元功能的关键证据^[101]. 此外, Aguilar 等^[102]改进了化学酶标记法, 使用 UDP-*N*-炔丙基半乳糖胺(UDP-GalNAI)为炔基供体, 实现了组织样本 O-GlcNAc 修饰的标记.

然而, 由于化学酶标记法操作步骤复杂可能导致反应不完全, 或在细胞复杂环境中可能发生未知副反应, 导致利用该方法所得结果可能存在假阳性. 最近, Tian 等^[103]通过对 Gal-T1(Y289L)进一步改造发展了一步化学酶法标记和捕获 O-GlcNAc 修饰蛋白技术. 通过结构分析, 将 GalT1 酶 297 位赖氨酸突变为丙氨酸(K297A)后, 能够为底物糖供体结合创造更大空间. 改造后的

GalT1 酶能够以 UDP-GalNAc-Biotin 为糖供体对糖蛋白进行一步法标记, 与既往的两步化学酶标法相比, 一步法具有更高的标记效率, 应用该方法研究者揭示了 O-GlcNAc 修饰在细胞周期进程和 DNA 损伤中的作用. 此外, Chen 等^[104]合作开发了一种兼具高效和通用性的 O-GlcNAc 糖肽富集鉴定新方法 CHO-GlcNAc. 该方法通过酶促反应将 Gal 基团转移到 O-GlcNAc 上, 然后利用 NaIO₄ 将 Gal 氧化, 进而使用可逆酰肼色谱捕获 O-GlcNAc 糖肽, 实现 O-GlcNAc 糖肽的高灵敏度检测. 应用该方法对 HeLa 细胞核蛋白的 O-GlcNAc 糖基化进行分析, 为 O-GlcNAc 糖基化参与应激小体形成的作用机制研究提供了新证据. Rexach 等通过化学酶法将 PEG 标签与 O-GlcNAc 修饰位点进行选择性连接, 使得被标记的糖蛋白分子量发生显著改变, 实现对内源性

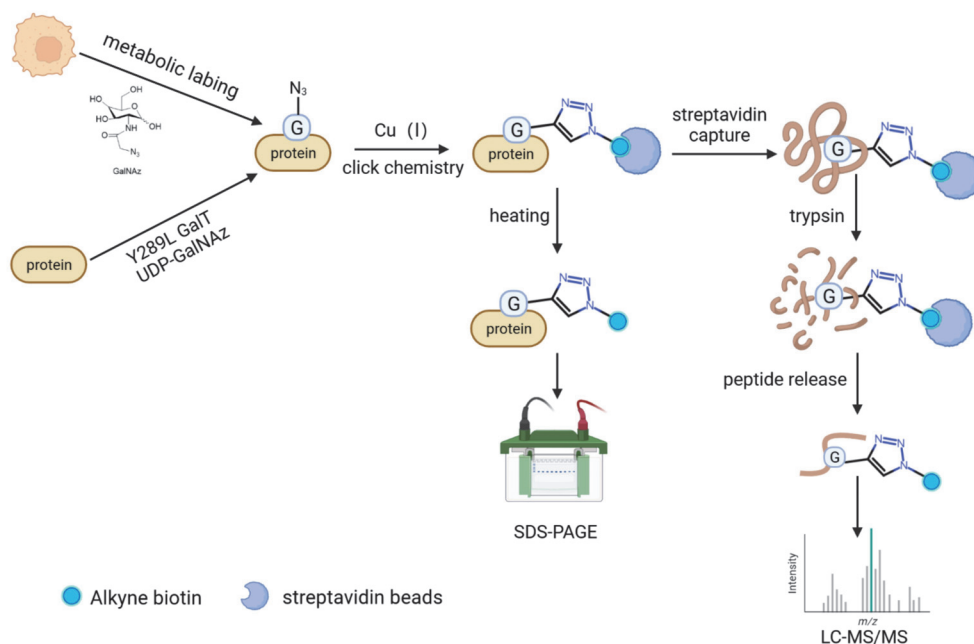


图5 O-GlcNAc 糖代谢标记和化学酶法标记流程

Figure 5 Process of metabolic labeling and chemoenzymatic labeling of O-GlcNAcylation

O-GlcNAc 蛋白质定量分析^[105]. Darabedian 等^[106]进一步对该方法进行了优化, 发展了一种完全使用商业试剂的点击化学方法, 并使用合成的 O-GlcNAc 修饰蛋白进行验证. Chen 等^[104]合作报道了一种 endo- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(Endo-M)突变体 Endo-M N175Q 介导的化学酶法, 用于糖肽的可逆标记. 他们利用化学酶法将 O-GlcNAc 基团与 N-聚糖连接, 利用亲水液相色谱进行糖肽分离和富集. 与经典的化学酶标记相比, 该方法实现了无标签的富集, 减少了标签对糖肽检测的干扰.

与非天然糖代谢标记法相比, 化学酶法不会干扰细胞内代谢途径, 且具有更高的标记效率^[107]. 两种 O-GlcNAc 糖蛋白标记方法通过引入生物正交反应基团, 均显著提高了糖蛋白的检测特异性.

4 基于化学工具的 O-GlcNAc 糖蛋白组学研究策略

由于 O-GlcNAc 修饰蛋白种类繁多, 单一蛋白的糖基化修饰相关研究无法满足相关研究的需要, 因此应用组学技术对 O-GlcNAc 糖蛋白进行系统性分析十分必要. 目前, 基于质谱的蛋白质组学技术已被广泛用于 O-GlcNAc 修饰蛋白的分析^[108-111], 这使得糖蛋白的富集策略成为这一领域的研究热点^[112]. 由于 O-GlcNAc 修饰识别抗体和凝集素对糖蛋白的富集存在特异性和不能识别所有 O-GlcNAc 糖蛋白的问题, 导致传统的糖蛋白富集方法应用存在局限. 化学酶法和非天然糖代谢标记技术成为目前应用最为广泛的 O-GlcNAc 修饰蛋白或糖肽富集方法.

Xu 等^[113]设计了一种结合 Ac₄GalNAz 代谢标记和蛋白质组学的方法, 实现在细胞核和胞质中对 O-GlcNAc 蛋白进行定量分析, 证实了白血病细胞中 O-GlcNAc 糖基化能够影响蛋白质的亚细胞定位和稳定性, 且胞质 O-GlcNAc 糖基化蛋白比核蛋白更稳定. Hahne 等^[114]利用 Ac₄GlcNAz 进行 O-GlcNAc 修饰蛋白质的富集, 树脂纯化后酶解肽段, LC-MS/MS 鉴定到大约 1500 个 O-GlcNAc 蛋白和 185 个 O-GlcNAc 修饰位点. Qin 等^[107]基于代谢标记技术和化学酶法标记技术, 发展了一系列定量化学蛋白质组学方法用于研究细胞中 O-GlcNAc 修饰的动态变化. 他们联合稳定同位素标记法(SILAC)的定量蛋白质组学技术和 O-GlcNAc 代谢标记技术, 开发了一种高效的、具有时间分辨力的 O-GlcNAc 定量化学蛋白质组学分析技术(qTOP), 发现了数十种 O-GlcNAc 修饰后异常稳定的蛋白质. 其中, O-GlcNAc 糖基化增强了多个核仁核糖体复合物组分的蛋白稳定性并以此促进该复合物的组装, 并进一步增强了宫颈癌细胞的增殖和动物模型成瘤性. 此外, Liu 等^[115]还结合化学酶法标记和还原二甲基化定量蛋白质组学技术, 首次建立了人胎盘滋养层细胞 O-GlcNAc 修饰蛋白数据库, 为后续研究奠定重要基础. 本文作者所在课题组前期开发了一种

基于 GalNAz 代谢标记的化学选择性 O-GlcNAc 蛋白结合染色质测序(chemoselective O-GlcNAc chromatin sequencing, COGC-seq)技术, 以此为工具, 结合 O-GlcNAc 染色质定位组学分析、代谢标记定量蛋白质组学和转录组学技术, 多层次系统分析了染色质结合的 O-GlcNAc 糖基化的转录调控因子及其调控的靶基因在乳腺癌细胞基因毒应激反应机制中的作用^[116], 证实 O-GlcNAc 糖基化在肿瘤细胞基因转录重编程中的重要生物学功能, 为更全面认识肿瘤等重大疾病的发生发展机制研究提供了多组学数据.

最近, He 等^[117]报道了光笼 OGT 技术. 他们使用遗传密码扩增技术对 OGT 关键活性位点(K842)进行暂时失活, 再利用紫外光解去除光笼小分子, 恢复 OGT 活性. 随后, 使用基于 GalT Y289L 化学酶标记技术进行定量蛋白质组学分析, 鉴定了在不同时间点被激活的 O-GlcNAc 修饰蛋白, 揭示了胞内蛋白具有不同的 O-GlcNAc 动态转换速率. Chen 等^[104]将 Endo-M N175Q 介导的化学酶法应用于核糖蛋白组学研究, 鉴定获得 73 个 O-GlcNAc 糖蛋白, 包括 120 条非冗余糖肽, 而没有经过 Endo-M 处理的样品仅得到 1/10 的糖肽.

此外, Liu 等^[118]报道了基于 TurboID 近距离标记系统开发的“GlycoID”标记策略, 在细胞内将生物素与 O-GlcNAc 蛋白修饰定向结合, 实现了不同亚细胞空间中的 O-GlcNAc 蛋白质和其互作复合物的时空特异性标记. 进一步应用该技术分析了 O-GlcNAc 糖蛋白组在胰岛素信号传导和细胞营养感知中的功能.

5 O-GlcNAc 糖基化位点的发现和位点特异性生物功能研究策略

尽管对蛋白质 O-GlcNAc 糖基化生物学功能相关研究已取得重要进展, 但破译底物蛋白的精确 O-GlcNAc 修饰位点仍极具挑战^[119]. 同一底物蛋白可在不同生理病理条件下在不同的 Ser/Thr 位点发生糖基化修饰, 加之同一位点的修饰效率亦存在差异, 使得 O-GlcNAc 糖基化存在异质性. 因此对底物蛋白 O-GlcNAc 糖基化位点的发现和位点特异性功能研究变得十分重要^[120-121]. 近年来, 高分辨质谱在蛋白质 O-GlcNAc 修饰位点鉴定中发挥了重要作用. 由于 O-GlcNAc 基团与 Ser/Thr 连接的糖苷键在质谱中易断裂, 同时糖肽的电离效率低, 使得原有的高能量碎裂模式在糖肽鉴定中应用有限^[122]. 电子转移解离(ETD)碎裂方法较温和, 不会打断 O-GlcNAc 基团与肽段的连接, 适用于研究 O-GlcNAc 修饰蛋白. 受限于 O-GlcNAc 的电中性特征, 而 ETD 碎裂模式对高带电量离子更有效, 加之该碎裂模式的扫描速度较低、碎裂效率低而导致该碎裂模式下有效谱图数产量较少. 因此 ETD 与其他碎裂模式的联用将有助于深入解析 O-GlcNAc 肽段. 将 ETD 与高能碰撞解离模式(HCD)结合, 所开发的高能碰

撞解离子产物依赖性 ETD(HCD *pd* ETD)^[123]和电子转移/高能碰撞撞解模式(ETDCD)^[124-125]近期被用于 O-GlcNAc 修饰肽段和位点的检测. 最近, 将 HCD 与 EThcD 优势相结合发展了 HCD *pd* EThcD 技术, 已用于 O-GlcNAc 糖基化位点的组学水平分析^[126]. 这些质谱碎裂方法为 O-GlcNAc 修饰位点的质谱鉴定提供了有效的工具.

基于此, 研究者们进一步开发了将 O-GlcNAc 修饰糖肽的富集方法与基于质谱的大规模糖基化位点鉴定相结合的研究策略, 能够实现组学水平的蛋白质 O-GlcNAc 位点解析和定量检测. 通过前文论述的非天然糖代谢标记技术和化学酶法标记技术, 联合生物正交点击化学反应, 利用可以切割的生物素探针, 如蛋白酶^[127]、酸切割 (DADPAS Alkyne biotin、Alkyne-AC-biotin)^[89]、UV 切割^[128] (Alkyne-PC-biotin)、氧化还原^[93,128]可裂解生物素探针, 通过与叠氮标记的 O-GlcNAc 基团反应(图 6), 能够实现体系中 O-GlcNAc 修饰糖肽的一次性富集和糖基化位点组学水平鉴定. Liu 等^[126]利用 GalT Y289L 化学酶标记法和 Alkyne-PC-biotin, 结合基于 HCD *pd* EThcD 质谱的蛋白质组学策略, 对不同细胞周期的宫颈癌细胞进行了 O-GlcNAc 修饰位点的组学鉴定. 他们在 621 个蛋白质上鉴定了 1325 个高置信的 O-GlcNAc 修饰位点. 与 O-GlcNAcAtlas 数据库相比, 新报道 499 个糖基化位点, 显著地扩展了细胞周期相关蛋白 O-GlcNAc 修饰信息. Li 等^[129]使用该策略, 利用 UV 切割生物素探针定量分析了索拉非尼耐药肝癌细胞中蛋白质的 O-GlcNAc 的修饰位点, 为 O-GlcNAc 糖基化调控肝癌耐药机理的研究奠定了基础. Khidekel 课题组^[130]则利用化学酶标记法和联合生物素探针, 解析皮质神经元内的 O-GlcNAc 修饰蛋白糖基化位点, 并进一步观察 O-GlcNAc 修饰的动态变化.

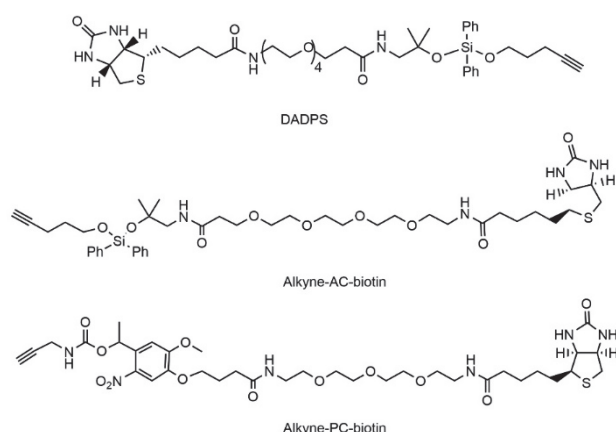


图 6 可剪切生物素探针化学结构
Figure 6 Chemical structures of cleavable alkyne-biotin probes

蛋白质 O-GlcNAc 糖基化位点特异性和定量分析对于理解 O-GlcNAc 修饰在疾病中的功能至关重要. 研究

者已开发了多种 O-GlcNAc 修饰定量分析方法, 包括无标记定量(LFQ)、细胞培养中氨基酸稳定同位素标记(SILAC)、用于相对和绝对定量的等压线标记(iTRAQ)等. LFQ 需要稳定的液相色谱性能, SILAC、iTRAQ 肽富集和同位素标记需要两步操作, 可能导致样品损失. 因此, 研究者相继开发了特异性、高灵敏、高通量鉴定 O-GlcNAc 糖基化位点的新方法. Woo 等^[131]报道了一种同位素靶向糖蛋白组学技术(IsoTaG), 能够改进低丰度糖肽的捕获和鉴定效率, 为诸如原代人类 T 细胞等珍贵样品的糖肽鉴定分析提供了新方案. Wang 等^[132]也报道了一种基于同位素标记的可切割接头(IsoTCL)分子, 用于 O-GlcNAc 修饰位点的鉴定和定量分析. 他们在阿尔兹海默症人脑组织获得了 530 种 O-GlcNAc 修饰蛋白, 包括 1850 条糖肽和 1094 个修饰位点. 进一步, Liu 等^[133]开发了一种 O-GlcNAc 图谱的同位素光裂解标记策略(IsoPTOP). 通过合成一对同位素标记的炔烃 PC 生物素捕获 O-GlcNAc 修饰肽段, 经光裂解使用轻/重同位素比定量 O-GlcNAc 修饰位点, 与 IsoTCL 技术相比具有更高的效率. 此外, 研究者继续开发了基于体外化学合成 O-GlcNAc 糖蛋白或糖肽的方法用于检测 O-GlcNAc 修饰位点. Frenkel-Pinter 等^[134]根据 TAU 蛋白衍生基序 VQIVYK 合成糖肽, 用于淀粉样蛋白糖基化对其聚集的研究. Levine 等^[135]则在体外合成了 O-GlcNAc 修饰的两种临床重要的肽: 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和甲状旁腺激素(PTH). O-GlcNAc 修饰可以提高 GLP-1 和 PTH 在血清中的稳定性, 并明显改善其体内活性. 最近, Lv 等^[136]利用半合成蛋白技术, 产生了位点特异性 O-GlcNAc 修饰的 SynGAP 蛋白, 证明了 SynGAP 的苏氨酸 1306 位 O-GlcNAc 修饰阻止了其 PSD-95 的相互作用, 从而抑制了神经元突触后的液-液相分离过程. 这些方法与策略的开发有效提高了 O-GlcNAc 糖基化位点的鉴定效率, 为精准、系统分析位点 O-GlcNAc 修饰的生物学功能提供了有效的技术手段^[122,137].

为了深入解析位点特异性 O-GlcNAc 修饰在疾病进展中的生物学功能(图 7a), 研究者开发了多种研究策略. 同样作为翻译后修饰而被广泛研究的蛋白质磷酸化, 在明确修饰位点后可通过位点突变模拟磷酸化缺失和磷酸化两种状态. 然而至今没有发现与被 O-GlcNAc 修饰的 Ser/Thr 结构近似的氨基酸残基, 目前研究者们仅能利用 Ser-Ala 或 Thr-Val 突变抑制底物蛋白的糖基化, 这种功能缺失的突变使人们能够观察到“敲除”一个特定位点的 O-GlcNAc 修饰造成的蛋白功能改变(图 7b). 例如, 对糖酵解途径关键酶磷酸果糖激酶 1(PFK1)的 ETD 质谱分析发现 Thr527 和 Ser529 是 PFK1 的候选 O-GlcNAc 糖基化位点^[138]. 经过细胞内验证, PFK1 的 S529A 突变可以阻止 O-GlcNAc 糖基化发生, 降低癌细胞增殖, 阻止肿瘤的形成. 而 Thr527 的突变则没有这一效应, 提示 Ser529 是 PFK1 的 O-GlcNAc 修饰位点, 具

有促进癌细胞增殖的功能. 此外, 利用位点突变证实了 p53 的 O-GlcNAc 糖基化位点为 Ser149, 该位点的糖基化与磷酸化修饰形成串扰, 共同调控了 p53 的肿瘤抑制功能^[139]. 尽管这种突变策略应用广泛, 但糖基化缺失突变仅能用于表征无修饰状态下的蛋白功能, 对于 O-GlcNAc 修饰后蛋白功能的解析作用有限. 因此, 研究者开发了多种目的蛋白质选择性装配 O-GlcNAc 基团的策略, 从而能够进行精确的功能研究. Gorelik 和 Maynard 等^[140-141]通过基因编辑技术将目的蛋白的特定 Ser/Thr 突变为 Cys, 进而利用 OGT 将含硫的 GlcNAc 类似物作为糖供体转移到半胱氨酸残基上, 使得目的蛋白的特异性位点发生 S-GlcNAc 糖基化(图 7c). 这一人工修饰不仅能模拟该位点发生糖基化的结构, 还能抵抗 OGA 对 GlcNAc 水解^[142], 这使得在目的蛋白特异性位点装配稳定存在的 GlcNAc 基团成为可能. Tegl 等^[143]则使用一种 GH20 己糖胺酶来源的工程化巯基糖醇化酶, 在体外将 S-GlcNAc 引入到目标蛋白的半胱氨酸残基, 生成糖蛋白的硫代类似物用于后续目的蛋白的功能分析. 最近, Ramirez 等报道了一种在活细胞中针对目的蛋白的 O-GlcNAc 修饰的策略^[144], 该方法利用工程化的 OGT 融合的纳米抗体识别目标蛋白并对其进行选择性 O-GlcNAc 修饰. 此外, 也可以利用纳米抗体融合的可分裂 OGA 对 O-GlcNAc 修饰进行选择性的去除^[145](图 7d).

这些化学生物学新技术和新策略的开发迅速扩展了对 O-GlcNAc 修饰蛋白和糖基化位点的认识. 基于此, 研究者们也先后建立了多个 O-GlcNAc 修饰蛋白生物信息学平台和数据库. 利用已有的 O-GlcNAc 蛋白修饰位点信息预测目标蛋白糖基化位点的数据库, 如

YinOYang 1.2、NetNGlyc^[146]、Glycosylation Predictor^[147], 能够通过打分蛋白质的 O-GlcNAc 位点给予预测性评价. 与磷酸化等其他翻译后修饰共用的数据库包括 PhosphoSite Plus^[148]、GlyGen^[149]、dbPTM^[150]等. 特异性 O-GlcNAc 修饰位点数据库 O-GlcNAcAtlas, 则收录了已报道的超过 3000 个人源糖蛋白的位点信息, O-GlcNAcome 数据库超过 7000 个人源蛋白的糖基化位点信息^[151]. 这些数据库对深入研究 O-GlcNAc 修饰的生物学功能有着重要的意义.

6 总结与展望

O-GlcNAc 糖基化作为一种细胞内广泛存在的单糖修饰在细胞生理和病理过程中发挥重要调控作用, 这一修饰可快速响应细胞环境变化, 发挥感受器功能迅速调节底物蛋白质的活性和生物学功能. 因此, 研究 O-GlcNAc 修饰生物学功能可能成为多种疾病发生机制和治疗策略研究提供新方向. 然而, 这种糖基化高度动态变化和低丰度特征极大增加了 O-GlcNAc 修饰蛋白的富集与分析难度. 随着代谢标记和化学酶法等化学生物学相关工具和策略的应用, O-GlcNAc 糖蛋白鉴定速度不断加快, 不断丰富 O-GlcNAc 糖基化修饰数据库信息, 因此持续更新 O-GlcNAc 修饰相关数据库至关重要. 其次, 目前基于代谢标记法鉴定出的蛋白质 O-GlcNAc 修饰位点中, 依然存在少量的硫代糖基化污染, 这些污染需通过对组学数据进行搜库时增加半胱氨酸的修饰进行去除. 虽然多种基于质谱的组学技术所鉴定的潜在 O-GlcNAc 修饰位点具有高置信度, 但 O-GlcNAc 糖基化位点的确认依然需要进一步生物学实验证实. 这就需

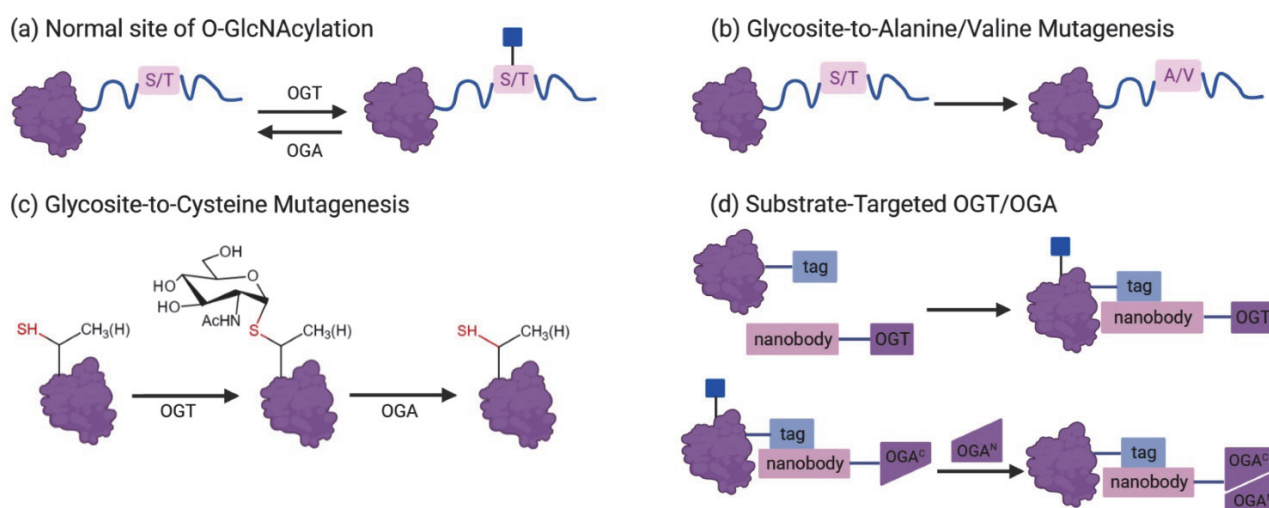


图 7 O-GlcNAc 糖基化位点特异性功能研究策略. (a) 酶催化的蛋白质 O-GlcNAc 修饰过程. (b)、(c) O-GlcNAc 特异性位点突变和人工 S-GlcNAc 糖基化. (d) 通过纳米抗体/标签将 OGT 催化结构域靶向蛋白质, 标记靶蛋白. 添加 O-GlcNAc 修饰. OGA 纳米抗体可以靶向去除 O-GlcNAc 修饰. **Figure 7** Several strategies used in site-specific research of O-GlcNAcylation. (a) Enzyme-catalyzed protein O-GlcNAcylation process. (b), (c) Site-directed mutagenesis and S-Glycosylation enables O-GlcNAc engineering at a specific site. (d) Targeting OGT catalytic domains to proteins through nanoantibodies or tags, labeling target proteins and adding O-GlcNAc modification. Similarly, OGA can be a nanoantibody targeted to remove O-GlcNAc

要持续稳定更新已有的 O-GlcNAc 蛋白数据库并改进 O-GlcNAc 修饰位点预测工具的准确性, 应用于 O-GlcNAc 糖基化调控疾病进展相关研究中。

化学生物学将在未来继续为 O-GlcNAc 糖基化研究提供新的研究工具和分析策略, 以此揭示更多 O-GlcNAc 参与调控的生理功能和疾病演进过程。由于单个蛋白可能发生多位点的 O-GlcNAc 糖基化, 不同修饰位点也可导致蛋白功能发生不同改变, 因此进一步定量分析 O-GlcNAc 动态修饰变化对全局和位点特异性地表征蛋白质 O-GlcNAc 修饰的生物学功能具有重要意义。糖基化位点的鉴定在 O-GlcNAc 修饰相关研究中始终被视为糖蛋白发现的重要依据, 这使得基于质谱的 O-GlcNAc 修饰蛋白质组学新技术成为该研究领域重要工具。

目前对于 O-GlcNAc 修饰的研究多基于化学小分子糖探针或者传统生物学基因敲除技术, 缺乏从疾病过程时间尺度和不同组织空间尺度上对 O-GlcNAc 修饰进行调节的策略和方法。因此, 这一领域还需要开发更多化学工具来检测和富集 O-GlcNAc 糖肽和糖蛋白, 实现不同时空尺度上精细研究 O-GlcNAc 在多种疾病中的动态调控作用。此外, 未来可以利用 CRISPR 阵列等基因组编辑工具筛选潜在的 O-GlcNAc 位点。进一步, 基于化学生物学技术开发特异性的 O-GlcNAc 位点生物传感器是另一重要的方向。例如, 将生物纳米粒子或 RNA 适配体等传感器引入特定的 O-GlcNAc 糖基化位点, 或者将生物传感器用于检测胞内的 UDP-GlcNAc 水平。这种 O-GlcNAc 位点的选择性检测方法将有助于将关键的 O-GlcNAc 位点表征作为生物标志物, 用于追踪 O-GlcNAc 修饰的生物功能在疾病中的作用。最后, 虽然 OGT 被证明与数以千计的 O-GlcNAc 修饰蛋白结合, 但 OGT 与底物互作及 O-GlcNAc 糖蛋白的精细结构的解析依然罕见报道, 这限制了研究者对 O-GlcNAc 糖基化相关机制的深入研究。未来可以将冷冻电镜和蛋白质核磁共振技术与 O-GlcNAc 糖基化研究策略相结合, 用以解析 OGT 与底物结合的结构特征, 阐释 O-GlcNAc 基团对蛋白构象的精细调控, 这将有助于基于结构的新 O-GlcNAc 糖探针开发和应用。

作者简介



张娜娜, 大连理工大学生物工程专业在读博士生, 研究方向为 O-GlcNAc 糖基化修饰与肿瘤生物学行为。



刘宇博, 大连理工大学生命科学与药学院副教授, 博士生导师, 主要研究方向为化学糖生物学和肿瘤糖生物学。以化学生物学和糖生物学交叉融合为手段, 开发高效、低毒糖探针, 发展化学糖组学研究新策略。2014 年大连理工大学生物化工专业博士毕业, 以第一作者或通讯作者在 *Nature Communications*, *Journal of Biological Chemistry*, *Cell death & Disease* 等期刊发表研究论文 30 余篇, 主持国家自然科学基金 3 项, 辽宁省自然科学基金 3 项。

References

- [1] Holt, G. D.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8049.
- [2] Shi, Q.; Shen, Q.; Liu, Y. *Cancer Cell* **2022**, *40*, 1207.
- [3] Hart, G. W.; Akimoto, Y. *The O-GlcNAc Modification*, Ed.: Varki, A., New York, **2009**, Chapter 18.
- [4] Peterson, S. B.; Hart, G. W. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *51*, 150.
- [5] Vaidyanathan, K.; Wells, L. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34466.
- [6] Akan, I.; Olivier-Van Stichelen, S.; Bond, M. R. *J. Neurochem.* **2018**, *144*, 7.
- [7] Banerjee, P. S.; Lagerlöf, O.; Hart, G. W. *Mol. Aspects Med.* **2016**, *51*, 1.
- [8] Nie, H.; Yi, W. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2019**, *20*, 437.
- [9] Phueaouan, T.; Chaityawat, P.; Netsirisawan, P. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 2929.
- [10] Ma, Z.; Vocadlo, D. J.; Vosseller, K. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 15121.
- [11] Jin, F. Z.; Yu, C.; Zhao, D. Z. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 1482.
- [12] Huang, X.; Pan, Q.; Sun, D. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36418.
- [13] Shi, Y.; Tomic, J.; Wen, F. *Leukemia* **2010**, *24*, 1588.
- [14] Dauphinee, S. M.; Ma, M.; Too, C. K. *J. Cell Biochem.* **2005**, *96*, 579.
- [15] Slawson, C.; Hart, G. W. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 678.
- [16] Shafi, R.; Iyer, S. P.; Ellies, L. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5735.
- [17] Yang, Y. R.; Song, M.; Lee, H. *Aging Cell* **2012**, *11*, 439.
- [18] Ferrer, C. M.; Lynch, T. P.; Sodi, V. L. *Mol. Cell* **2014**, *54*, 820.
- [19] Alteen, M. G.; Tan, H. Y.; Vocadlo, D. J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *68*, 157.
- [20] Wang, Y. *Acta Chim. Sinica* **2013**, *71*, 1477 (in Chinese). (王玥, 化学学报, **2013**, *71*, 1477.)
- [21] Konrad, R. J.; Zhang, F.; Hale, J. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 207.
- [22] Vibjerg Jensen, R.; Johnsen, J.; Buus Kristiansen, S. *Scand Cardiovasc J.* **2013**, *47*, 168.
- [23] Borodkin, V. S.; Schimpl, M.; Gundogdu, M. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 497.
- [24] Gloster, T. M.; Zandberg, W. F.; Heinonen, J. E. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 174.
- [25] Sodi, V. L.; Bacigalupa, Z. A.; Ferrer, C. M. *Oncogene* **2018**, *37*, 924.
- [26] Liu, T. W.; Zandberg, W. F.; Gloster, T. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7644.
- [27] Rafie, K.; Gorelik, A.; Trapannone, R. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1834.
- [28] Gross, B. J.; Kraybill, B. C.; Walker, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14588.
- [29] Jiang, J.; Lazarus, M. B.; Pasquina, L. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *8*, 72.
- [30] Ortiz-Meoz, R. F.; Jiang, J.; Lazarus, M. B. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1392.

- [31] Rahman, M. A.; Cho, Y.; Hwang, H. *Brain Sci.* **2020**, *10*, 958.
- [32] Liu, Y.; Cao, Y.; Pan, X. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 485.
- [33] Lee, S. J.; Lee, D. E.; Choi, S. Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11073.
- [34] Lee, S. J.; Kwon, O. S. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 3154.
- [35] Luanpitpong, S.; Kang, X.; Janan, M. *Stem Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 274.
- [36] Martin, S. E. S.; Tan, Z.-W.; Itkonen, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13542.
- [37] Liu, X.; Song, S.; Chen, Z. *Acta Biomater.* **2022**, *151*, 148.
- [38] Wang, Y.; Zhu, J.; Zhang, L. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 263.
- [39] Liu, Y.; Ren, Y.; Cao, Y. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12334.
- [40] (a) Liu, Y. B.; Zhang, N. N.; Chen, J. J. *Chem. J. Chinese Univ.* **2018**, *39*, 1185 (in Chinese). (刘宇博, 张娜娜, 陈锦娇, 高等学校化学学报, **2018**, *39*, 1185.) (b) Liu, X.; Zhang, N.; Cao, Y. *Chin. Pharmacol. Bull.* **2020**, *36*, 1574 (in Chinese). (刘欣, 张娜娜, 曹禺, 中国药理学通报, **2020**, *36*, 1574.)
- [41] Zhang, N.; Zhu, T.; Yu, K. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 343.
- [42] Huang, H.; Wu, Q.; Guo, X. *J. Cell Physiol.* **2021**, *236*, 7491.
- [43] Albuquerque, S. O.; Barros, T. G.; Dias, L. R. S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *154*, 105510.
- [44] Horsch, M.; Hoersch, L.; Vasella, A. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 815.
- [45] Laczy, B.; Marsh, S. A.; Brocks, C. A. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H1715.
- [46] Macauley, M. S.; Whitworth, G. E.; Debowski, A. W. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25313.
- [47] Macauley, M. S.; He, Y.; Gloster, T. M. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 937.
- [48] Dorfmueller, H. C.; Borodkin, V. S.; Schimpl, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16484.
- [49] Yuzwa, S. A.; Macauley, M. S.; Heinonen, J. E. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 483.
- [50] Hilgers, R. H.; Xing, D.; Gong, K. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H513.
- [51] Zhu, Q.; Zhou, H.; Wu, L. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 1087.
- [52] Selnick, H. G.; Hess, J. F.; Tang, C. J. *Med. Chem.* **2019**, *62*, 10062.
- [53] Yang, Y.; Li, X.; Luan, H. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 16616.
- [54] Martínez-Vituro, C. M.; Trabanco, A. A.; Royes, J. J. *Med. Chem.* **2020**, *63*, 14017.
- [55] González-Cuesta, M.; Sidhu, P.; Ashmus, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 832.
- [56] Klein, A. L.; Berkaw, M. N.; Buse, M. G. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2733.
- [57] Snow, C. M.; Senior, A.; Gerace, L. J. *Cell. Biol.* **1987**, *104*, 1143.
- [58] Comer, F. I.; Vosseller, K.; Wells, L. *Anal. Biochem.* **2001**, *293*, 169.
- [59] Turner, J. R.; Tartakoff, A. M.; Greenspan, N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 5608.
- [60] Yoshida, N.; Mortara, R. A.; Araguth, M. F. *Infect Immun.* **1989**, *57*, 1663.
- [61] Teo, C. F.; Ingale, S.; Wolfert, M. A. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 338.
- [62] Kamemura, K.; Hayes, B. K.; Comer, F. I. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19229.
- [63] Yuzwa, S. A.; Yadav, A. K.; Skorobogatko, Y. *Amino Acids* **2011**, *40*, 857.
- [64] Hirose, M.; Hayakawa, K.; Yoneda, C. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31785.
- [65] Pathak, S.; Borodkin, V. S.; Albarbarawi, O. *Embo J.* **2012**, *31*, 1394.
- [66] Fujioka, K.; Kubota, Y.; Takekawa, M. *Bio-protocol* **2018**, *8*, e3098.
- [67] Soesanto, Y. A.; Luo, B.; Jones, D. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E974.
- [68] Diwu, Y.; Tian, J.; Shi, J. *J. Tradit. Chin. Med.* **2013**, *33*, 367.
- [69] Ma, Z. Y.; Skorobogatko, Y.; Vosseller, K. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *951*, 21.
- [70] Vosseller, K.; Trinidad, J. C.; Chalkley, R. J. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 923.
- [71] Liu, W.; Han, G.; Yin, Y. *Glycobiology* **2018**, *28*, 363.
- [72] Su, Y.; Ye, X.; Xu, B. *Glycobiology* **2020**, *30*, 159.
- [73] Schimpl, M.; Borodkin, V. S.; Gray, L. J. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 173.
- [74] Mariappa, D.; Selvan, N.; Borodkin, V. *Biochem. J.* **2015**, *470*, 255.
- [75] Selvan, N.; Williamson, R.; Mariappa, D. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 882.
- [76] Song, J.; Liu, C.; Wang, X. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 1040.
- [77] Isono, T. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e18959.
- [78] Gilormini, P. A.; Batt, A. R.; Pratt, M. R. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7585.
- [79] Cheng, B.; Tang, Q.; Zhang, C. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)* **2021**, *14*, 363.
- [80] Vocadlo, D. J.; Hang, H. C.; Kim, E. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9116.
- [81] Yu, S. H.; Boyce, M.; Wands, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 4834.
- [82] Zhu, Y.; Wu, J.; Chen, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9301.
- [83] Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14846.
- [84] Boyce, M.; Carrico, I. S.; Ganguli, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 3141.
- [85] Xu, S.; Zheng, J.; Xiao, H. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 3343.
- [86] Zhu, Y.; Willems, L. I.; Salas, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15729.
- [87] Lin, W.; Gao, L.; Chen, X. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2571.
- [88] Qin, W.; Qin, K.; Fan, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1817.
- [89] Hao, Y.; Fan, X.; Shi, Y. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4065.
- [90] Qin, K.; Zhang, H.; Zhao, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 9382.
- [91] Zaro, B. W.; Yang, Y. Y.; Hang, H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 8146.
- [92] Chuh, K. N.; Zaro, B. W.; Piller, F. J. *Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283.
- [93] Chuh, K. N.; Batt, A. R.; Zaro, B. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7872.
- [94] Darabedian, N.; Gao, J.; Chuh, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7092.
- [95] Pedowitz, N. J.; Jackson, E. G.; Overhulse, J. M. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 1924.
- [96] Lin, W.; Gao, L.; Chen, X. *ChemBiochem* **2015**, *16*, 2571.
- [97] Torres, C. R.; Hart, G. W. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3308.
- [98] Khidekel, N.; Arndt, S.; Lamarre-Vincent, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16162.
- [99] Clark, P. M.; Dweck, J. F.; Mason, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11576.
- [100] Balana, A. T.; Mukherjee, A.; Nagpal, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 16030.
- [101] Khidekel, N.; Ficarro, S. B.; Peters, E. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13132.
- [102] Aguilar, A. L.; Hou, X.; Wen, L. *ChemBiochem* **2017**, *18*, 2416.
- [103] Tian, Y.; Zhu, Q.; Sun, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26128.
- [104] Chen, Y.; Tang, F.; Qin, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202117849.
- [105] Rexach, J. E.; Rogers, C. J.; Yu, S. H. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 645.
- [106] Darabedian, N.; Thompson, J. W.; Chuh, K. N. *Biochemistry* **2018**, *57*, 5769.
- [107] Qin, W.; Lv, P.; Fan, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E6749.
- [108] Ma, J.; Hart, G. W. *Clin. Proteomics* **2014**, *11*, 8.
- [109] Thompson, J. W.; Sorum, A. W.; Hsieh-Wilson, L. C. *Biochemistry* **2018**, *57*, 4010.
- [110] Maynard, J. C.; Chalkley, R. J. *Mol. Cell. Proteomics* **2021**, *20*, 100031.
- [111] Ma, J.; Wu, C.; Hart, G. W. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 1513.
- [112] Li, Y. Y.; Peng, Y.; Lu, H. J. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 705 (in Chinese). (李月悦, 彭叶, 陆豪杰, 化学学报, **2021**, *79*, 705.)
- [113] Xu, S.; Tong, M.; Suttapitugsakul, S. *Cell Rep.* **2022**, *39*, 110946.
- [114] Hahne, H.; Sobotzki, N.; Nyberg, T. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 927.
- [115] Liu, J.; Shao, X.; Qin, W. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 788.
- [116] Liu, Y.; Chen, Q.; Zhang, N. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5898.
- [117] He, J.; Fan, Z.; Tian, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 4289.
- [118] Liu, Y.; Nelson, Z. M.; Reda, A. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 2153.
- [119] Banerjee, P. S.; Hart, G. W.; Cho, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4345.
- [120] Wulff-Fuentes, E.; Berendt, R. R.; Massman, L. *Sci. Data* **2021**, *8*, 25.
- [121] Ma, J.; Li, Y.; Hou, C. *Glycobiology* **2021**, *31*, 719.
- [122] Woo, C. M.; Lund, P. J.; Huang, A. C. *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, *17*, 764.
- [123] Zhao, P.; Viner, R.; Teo, C. F. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4088.
- [124] Zhang, Y.; Xie, X.; Zhao, X. *J. Proteomics* **2018**, *170*, 14.
- [125] Marino, F.; Bern, M.; Mommen, G. P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10922.
- [126] Liu, J.; Hao, Y.; He, Y. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 1917.
- [127] Santala, V.; Saviranta, P. *J. Immunol. Methods* **2004**, *284*, 159.
- [128] Wang, Z.; Udeshi, N. D.; O'Malley, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*, 153.
- [129] Li, J.; Li, Z.; Duan, X. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 4.
- [130] Khidekel, N.; Ficarro, S. B.; Clark, P. M. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 339.

- [131] Woo, C. M.; Iavarone, A. T.; Spiciarich, D. R. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 561.
- [132] Wang, S.; Yang, F.; Petyuk, V. A. *J. Pathol.* **2017**, *243*, 78.
- [133] Liu, J.; Hao, Y.; Wang, C. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 513.
- [134] Frenkel-Pinter, M.; Richman, M.; Belostozky, A. *Chemistry* **2016**, *22*, 5945.
- [135] Levine, P. M.; Balana, A. T.; Sturchler, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14210.
- [136] Lv, P.; Du, Y.; He, C. *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 831.
- [137] Li, J.; Li, Z.; Duan, X. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 4.
- [138] Yi, W.; Clark, P. M.; Mason, D. E. *Science* **2012**, *337*, 975.
- [139] Yang, W. H.; Kim, J. E.; Nam, H. W. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1074.
- [140] Gorelik, A.; Bartual, S. G.; Borodkin, V. S. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 1071.
- [141] Maynard, J. C.; Burlingame, A. L.; Medzihradszky, K. F. *Mol. Cell. Proteomics* **2016**, *15*, 3405.
- [142] Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Vocadlo, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17202.
- [143] Tegl, G.; Hanson, J.; Chen, H. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 1632.
- [144] Ramirez, D. H.; Aonbangkhen, C.; Wu, H. Y. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1059.
- [145] Ge, Y.; Ramirez, D. H.; Yang, B. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 593.
- [146] Gupta, R.; Brunak, S. *Pac Symp Biocomput* **2002**, 310.
- [147] Hamby, S. E.; Hirst, J. D. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 500.
- [148] Hornbeck, P. V.; Kornhauser, J. M.; Latham, V. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D433.
- [149] York, W. S.; Mazumder, R.; Ranzinger, R. *Glycobiology* **2020**, *30*, 72.
- [150] Huang, K. Y.; Lee, T. Y.; Kao, H. J. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D298.
- [151] Cekic, N.; Heinonen, J. E.; Stubbs, K. A. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3742.

(Cheng, B.)