

文章编号 1672-6634(2024)01-0092-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023100003

O-GlcNAc 糖基化修饰的研究进展

王梦荷, 郑路, 孟领航, 王佳佳

(河南大学 抗体药物开发技术国家地方联合工程实验室, 河南 开封 475000)

摘要 蛋白质的 N-乙酰氨基葡萄糖(O-linked-N-acetylglucosamine, GlcNAc)修饰是一种广泛存在于真核细胞内的 O-连接的单糖修饰,其通过 β -糖苷键将 GlcNAc 与细胞质或核蛋白上的丝氨酸或苏氨酸残基结合。O-GlcNAc 糖基化修饰可以调控基因的表达、调节信号转导、参与免疫保护和细胞代谢等生理过程,其异常表达与某些疾病相关,如糖尿病、癌症、心血管和神经退行性疾病等,明确蛋白质的糖基化修饰位点对阐明疾病的发生具有重要意义。由于 O-GlcNAc 修饰是一种动态、化学计量的修饰,质谱检测信号响应低,导致位点鉴定困难。本文将基于 O-GlcNAc 的生物学功能,对 O-GlcNAc 糖蛋白的富集方法进行归纳总结,为未来 O-GlcNAc 相关研究提供思路。

关键词 O-GlcNAc 糖基化修饰;分子探针;代谢标记

中图分类号 R9

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Progress of O-GlcNAc Modification

WANG Menghe, ZHENG Lu, MENG Linghang, WANG Jiajia

(Joint National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Henan University, Kaifeng 475000, China)

Abstract Protein O-GlcNAc glycosylation, a type of O-linked monosaccharide modification, involves the β -linkage of GlcNAc to serine or threonine residues of cytoplasmic or nuclear proteins, which is widely found in eukaryotic cells. O-GlcNAc modification participates in a large account of biological processes, including gene expression, signal transduction, immunoprotection and cell metabolism, et al., Aberrant O-GlcNAc modification will lead to various diseases, such as diabete, cancer, angiocardopathy and neuro-degeneration. Moreover, identification of O-GlcNAcylated proteins will facilitate to understand the regulatory mechanism in associated diseases. It is very difficult to identify the O-GlcNAc modification site in MS with low responsive signals because O-GlcNAcylation is a dynamic and stoichiometric modification. Here, in this paper, we will summarize the important roles of O-GlcNAcylation in biological processes, as well as the enrichment methods for O-GlcNAc modification, which will provide methods for researchers to investigate O-GlcNAcylation.

Key words O-GlcNAc modification; molecular probes; metabolic labeling

收稿日期:2023-10-09

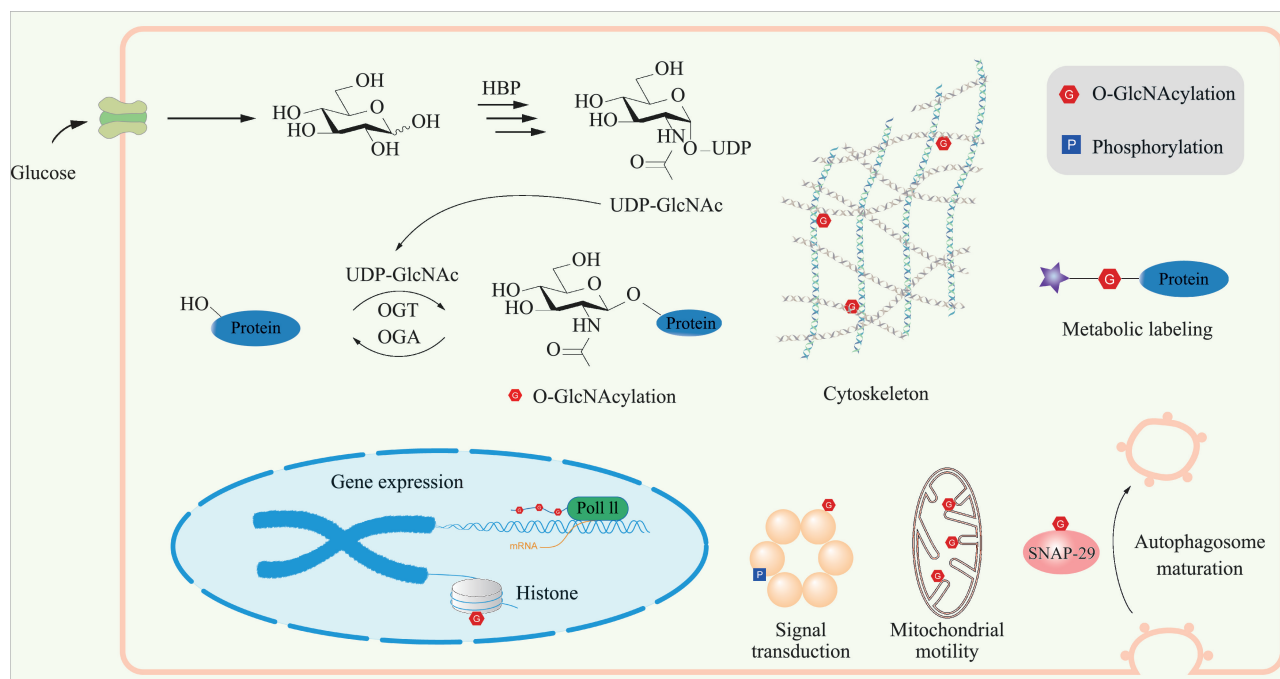
基金项目:国家自然科学基金青年项目(21907022),河南省科技攻关项目(232102311167)资助

通信作者:王佳佳,男,汉族,博士,副教授,研究方向:糖化学生物学,E-mail: jwang577@163.com.

0 引言

O-GlcNAc 糖基化修饰是蛋白质翻译后修饰的主要形式之一。根据糖链的连接方式不同,蛋白质的糖基化可以分为 N-糖基化、O-糖基化、C-甘露糖化以及糖基磷脂酰肌醇间接连接的糖基化,其中 O-糖基化和 N-糖基化修饰是最广泛的两种方式^[1]。

O-GlcNAc 糖基化是将 O-连接的 β -N-乙酰氨基葡萄糖与细胞内蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基相结合的一种翻译后修饰(图 1)。O-GlcNAc 糖基化与蛋白质的 O-磷酸化修饰方法类似,都是对蛋白质丝氨酸和苏氨酸残基的侧链羟基进行修饰,但这两种修饰方式对底物的特异性识别机制完全不同。与磷酸化众多的激酶和磷酸酶协同参与不同,O-GlcNAc 糖基化动态循环仅由一对酶在体内参与:O-GlcNAc 转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)和 O-GlcNAc 水解酶(O-GlcNAcase, OGA)^[2]。O-GlcNAc 糖基化修饰的独特之处在于:(1) 只发生于细胞核和细胞质中;(2) 参与修饰的结构仅由 GlcNAc 单糖修饰,不会形成复杂的糖链结构;(3) 是一种可逆的、可诱导的、动态的翻译后修饰。细胞内 O-GlcNAc 糖基化的糖基供体尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)是氨基己糖生物合成途径(Hexosamine biosynthesis pathway, HBP)的产物,OGT 将 UDP-GlcNAc 转移到目标蛋白底物的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上,而 OGA 催化将其去除^[3]。研究发现这种形式的胞内蛋白糖基化几乎调节所有细胞生命活动过程,包括转录翻译、信号转导、调节蛋白质间相互作用以及蛋白质的定位等。另外 UDP-GlcNAc 的合成也需要细胞内某些营养物质,如氨基酸,核苷酸和脂肪酸等,同时也有研究发现 OGT 的酶活性和 O-GlcNAc 糖基化水平主要取决于糖基供体 UDP-GlcNAc 的多少,所以 O-GlcNAc 被看作是体内细胞营养物质代谢的感受器^[4]。



注:进入细胞的小部分葡萄糖经过氨基己糖生物合成途径(HBP)生成 UDP-GlcNAc,在 OGT 催化下将 UDP-GlcNAc 转移到目标蛋白底物的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上,如对细胞骨架,线粒体,SNAP、组蛋白等修饰;O-GlcNAc 糖基化和磷酸化一样是常见的蛋白质翻译后修饰,参与信号传导,影响蛋白质的结构,调控修饰蛋白质的生物学功能。

Note: A small portion of glucose entering the cell undergoes the aminohexose biosynthesis pathway (HBP) to generate UDP-GlcNAc, which is then transferred to the hydroxyl group of serine or threonine residues in the target protein substrate by OGT, such modifications include the cytoskeleton, mitochondrion, SNAP, and histone, etc.; O-GlcNAcylation, as similar with phosphorylation, is a common post-translational modification of proteins, involving in signals transduction, affecting the structure of proteins, and regulating the biological functions of the modified proteins.

图 1 O-GlcNAc 的生物合成途径和细胞内修饰

Fig. 1 Biosynthetic pathway of O-GlcNAc and its modification in intracellular

1 O-GlcNAc 糖基化修饰的生理及病理意义

1.1 O-GlcNAc 糖基化修饰的生理学作用

1.1.1 参与基因转录调节。O-GlcNAc 糖基化在基因转录翻译过程中发挥了重要的作用,可通过修饰与转录相关的蛋白质调节其转录活性。O-GlcNAc 可修饰 RNA 聚合酶 II 和基础转录复合物,也可直接调控多种转录因子的活性,包括 Sp1、雌激素受体、STAT 5(信号转导和转录激活因子 5)、p53、YY1(阴阳 1)、CREB(cAMP 反应元件结合)等。除了直接调节转录外,O-GlcNAc 还在介导表观遗传学中发挥着重要作用。例如,有研究表明组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4)可发生 O-GlcNAc 修饰。此外,许多表观遗传调控因子本身存在 O-GlcNAc 修饰或与 OGT/OGA 相关^[5]。转录因子 Sp1(transcription factor 1)作为一种 DNA 结合蛋白,具有序列特异性,可调控某些含有 GC/GT 序列的启动子的核病毒基因转录过程和多种机体生理以及病理过程。机体在缺乏营养的情况下,Sp1 可以发生去糖基化最终导致蛋白酶体降解,这一过程使依赖于 Sp1 表达的基因转录水平下调^[6]。

1.1.2 调节细胞周期。在细胞周期进程中,O-GlcNAc 糖基化水平在不同阶段有所波动^[7],O-GlcNAc 糖基化是一种单糖修饰,由于其不局限于细胞表面和分泌蛋白,可作为蛋白质的翻译后修饰参与减数分裂进程,并在衰老过程中驱动精细胞发生损害,O-GlcNAc 的扰动也会损害雌性配子的发生。OGA 破坏导致的 O-GlcNAc 糖基化水平升高会导致胚胎有丝分裂缺陷,包括胞质分裂失败、染色体滞后和双核等^[8]。有研究表明,某些癌细胞系中的 OGT 抑制导致细胞增殖减少而不诱导细胞死亡,这可能是由于诱导了细胞周期阻滞。综上所述在细胞周期的有丝分裂和减数分裂过程中,维持 O-GlcNAc 稳态具有重要意义^[9]。

1.1.3 参与蛋白质调节。O-GlcNAc 糖基化修饰可以提高蛋白质的稳定性。O-GlcNAc 糖基化修饰大多数位于与蛋白质相关的 PEST 序列上,O-GlcNAc 糖基化通过修饰该序列可抑制靶蛋白的降解,从而提高蛋白质的稳定性。有文章报道 O-GlcNAc 糖基化修饰在调节稳定蛋白质方面的另一种临床应用:O-GlcNAc 糖基化在某些情况下能够产生较高的 cAMP 信号。这种单糖使人体血清中胰高血糖素样肽-1(GLP-1)在体外的降解速度比未经修饰的多肽减慢了两倍左右,显著改善了机体对葡萄糖的代谢。O-GlcNAc 糖基化修饰可以在体外增加血清中甲状旁腺激素(PTH)的半衰期,提高 PTH 在体内的活性和稳定性,我们可以推测 O-GlcNAc 糖基化修饰同样可用于其他类型的多肽^[10]。

1.1.4 介导应激反应。大量研究表明,动态的蛋白质 O-GlcNAc 糖基化是一种保守的细胞内信号机制,可被多种应激源激活,在急性应激前后,提高细胞 O-GlcNAc 水平具有一定的保护作用,而降低细胞 O-GlcNAc 水平可产生损害^[11]。O-GlcNAc 在 5000 多种蛋白质中参与修饰,以响应各种影响蛋白质功能的刺激,这与心血管疾病和神经退行性疾病密切相关。有研究表明 O-GlcNAc 转移酶(OGT)可发挥应激传感器的作用,在抑郁症患者中,OGT mRNA 增加,选择性删除星形胶质细胞 OGT 产生抗抑郁样作用,内侧前额叶皮层(mPFC)中的星形细胞 OGT 通过谷氨酸转运体-1(GLT-1)的 O-GlcNAc 糖基化调节抑郁样行为^[12]。

1.1.5 参与免疫调节。O-GlcNAc 在免疫系统中发挥重要作用。研究发现 O-GlcNAc 糖基化可以促进 T 细胞和 B 细胞的发育、增殖和活化,调节巨噬细胞的炎症和抗病毒反应,促进活化的中性粒细胞的功能,抑制自然杀伤细胞的活性^[13],并可作为糖尿病和胰岛素抵抗的促炎介质^[14]。由于蛋白质磷酸化在调节先天免疫信号传导的许多方面起着重要作用且 O-GlcNAc 糖基化修饰与磷酸化存在相互拮抗或相互促进的阴阳关系,越来越多的证据表明,参与 NF- κ B 通路和其他炎症相关信号通路的蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化在调节先天免疫细胞的功能中起着重要作用^[15]。

1.2 O-GlcNAc 糖基化修饰与疾病的关系

1.2.1 II型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)。又称非胰岛素依赖型糖尿病,是一种慢性代谢缺陷性疾病,患者特征为高血糖,胰岛素水平正常。研究发现胰岛素可通过其受体使 OGT 磷酸化,从而提高 OGT 的活性,OGT 的活性与 I 型和 II 型糖尿病有关。在 II 型糖尿病中,矿化皮质激素受体(Mineralocorticoid Receptor, MR)的 O-GlcNAc 糖基化可直接增加高糖条件下受体的蛋白质水平和转录活性^[16]。此外,O-GlcNAc 糖基化被认为是一个重要的营养传感器,能够调节广泛生理反应过程,在妊娠糖尿病中,胎盘滋养细胞生长激素分泌过多,OGT 的下调可能有助于胰岛素抵抗^[17]。

1.2.2 神经退行性疾病(neurodegenerative disease, ND)。ND 是一类慢性进行性大脑和脊髓的细胞神经元退行性变性、减少而导致的疾病的总称。包括帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症等。在神经系统的发育过程中,O-GlcNAc 对神经元的正常发育和功能起着关键作用,这对于建立营养感知功能失调与早期神经系统疾病之间的联系至关重要^[18]。脑糖代谢受损被认为是脑功能障碍和神经变性的标志,氨基己糖生物合成途径(HBP)代谢失调和 O-GlcNAc 异常循环与神经元疾病的诱导或进展有关^[19]。与其他器官相比,大脑的 O-GlcNAc 糖基化程度更高,O-GlcNAc 糖基化修饰水平异常与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)密切相关。阿尔茨海默病的特征包括淀粉样斑块和神经原纤维 tau 缠结。Tau 是一种调节神经元细胞骨架稳定性的微管结合蛋白,在阿尔茨海默病中,tau 蛋白异常磷酸化,并积聚成有毒的神经原纤维缠结。神经组织中 OGT 缺失会增加 tau 蛋白的过度磷酸化,慢性药物抑制 OGA 可减少病理性 tau。tau 蛋白的 O-GlcNAc 糖基化使其不聚集。其中过度磷酸化的 tau 与 tau 的 O-GlcNAc 糖基化呈反比^[20]。

1.2.3 肿瘤。许多肿瘤细胞表现出糖酵解增强和线粒体代谢抑制,这种现象被称为“Warburg”效应,对肿瘤的发展至关重要^[21]。患者肿瘤组织中 OGT 高表达,OGA 低表达,并出现高水平的 O-GlcNAc 糖基化^[22]。在起源于 B 细胞前体的急性淋巴细胞白血病中,增殖前 B 细胞阶段的 O-GlcNAc 糖基化修饰显著,通过抑制其修饰下调 c-myc 的表达。大量研究证明依赖于 O-GlcNAc 糖基化修饰表达的 c-myc 是调控前 B 细胞增殖的重要组分,也是治疗前急性淋巴细胞白血病的关键靶点^[23]。

2 O-GlcNAc 糖基化蛋白的富集和鉴定

O-GlcNAc 在细胞调控蛋白质中广泛存在,但由于其化学计量低且富集效率有限,且 O-GlcNAc 糖基化肽离子信号会被大量的未修饰的离子信号掩盖而被抑制,其功能研究落后于其他翻译后修饰(PTMs)^[24]。从蛋白质组学的角度发展的富集和定量技术,结合质谱(MS)进行大规模的 O-GlcNAc 分析,这使鉴定更多糖基化蛋白和糖基化位点成为可能(图 2)。

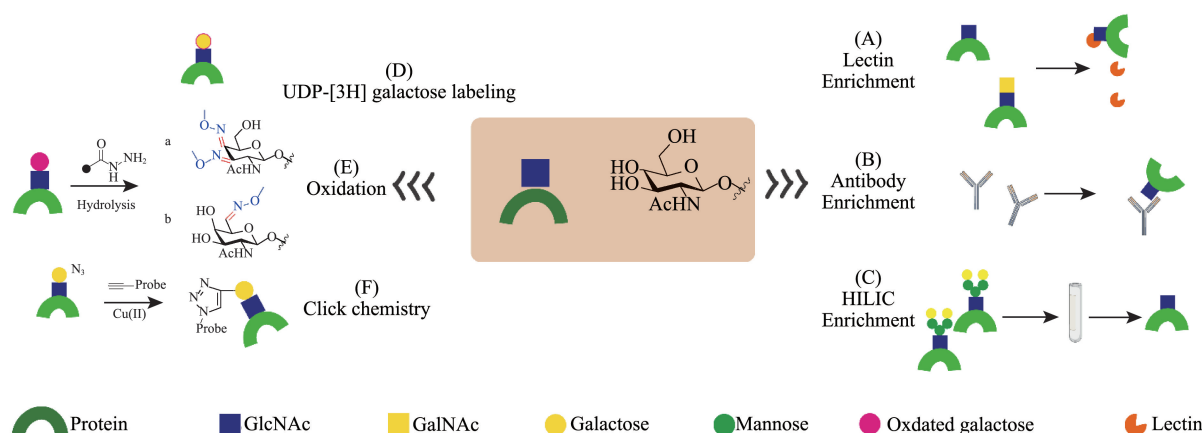


图 2 检测 O-GlcNAc 修饰的各种标记策略

Fig. 2 Various strategies to detect O-GlcNAc modifications

2.1 抗体和凝集素富集法

抗体是一类能与抗原特异性结合的免疫球蛋白。O-GlcNAc 抗体是为特定的糖基化表位生产的,目前常用的特异性抗体有两种:一种是利用合成的 O-GlcNAc 糖基化 RNA 聚合酶 II C 端重复片段作为免疫原而开发的 IgM 类抗体,如 CTD110.6,一种是针对 O-GlcNAc 修饰的糖基化核孔蛋白片段的 IgG 型抗体,如 RL2^[25]。但是这些抗体的亲和力较低、特异性有限,在许多情况下只能用于多个修饰的,分子量大的蛋白质。除了最常见的这两种,市售的还有将近 200 种 O-GlcNAc 抗体,这些抗体具有表位特异性或存在对高富集蛋白和低富集蛋白的选择性,因此存在一定局限性^[26]。可通过对 O-GlcNAc 糖基化蛋白进行富集或使用抗体组合提升适用性。

除了抗体,一些植物凝集素,如小麦胚芽凝集素(Wheat germ agglutinin, WGA),蛋白质的多个位点 O-GlcNAc 修饰可以增强 WGA 与单糖的亲和力,便于更有效的分离,但 WGA 对 GlcNAc 结合力较弱。Vosseller 等

人开发了一种凝集素亲和色谱法(LWAC),通过从神经元突触后富集到 145 个特异 O-GlcNAc 糖基化肽,鉴定出了 63 个蛋白肽段^[27],以及 Liu 团队报道了一种 AANL 凝集素,是一种富集和鉴定 O-GlcNAc 糖基化蛋白和肽新工具^[28]。

2.2 化学酶标记富集法

化学酶法标记富集蛋白策略通常需要两步,首先 GalT(Y289L)将 UDP-GalNAz 选择性共价修饰天然存在的 O-GlcNAc 糖基化蛋白的 GlcNAc 部分,然后通过碘化亚铜介导的叠氮烷基环加成(CuAAC)反应进一步富集 O-GlcNAc 糖基化蛋白^[29]。浙江大学易文课题组开发了一种一步化学酶标记策略,利用 GalT 突变体开发了 O-GlcNAc 糖基化分析策略,该策略用(GalT-K279A)直接将 UDP-GalNAz 共价连接到 O-GlcNAc 糖基化蛋白,与传统的两步酶标记法相比,一步化学酶标记法对 O-GlcNAc 糖基化蛋白的富集和分析灵敏度更高^[30]。目前的化学酶标记方法不可避免地要在糖肽上引入了庞大的标签(大多数为 300 kDa),对鉴定效率产生了负面影响,理想的化学酶方法应该能够特异地富集 O-GlcNAc 糖基化肽,且不引入庞大的标签。有研究报道了一种可逆的 O-GlcNAc 糖基化肽的化学酶标记策略,其中 O-GlcNAc 部分被 Endo-M N175Q 延长,酶加的聚糖在 HILIC 富集后进一步被 Endo-M/S WT 去除。与基于 GalT 突变体的方法相比,该方法操作方便,避免了笨重标签对糖肽鉴定的干扰^[31]。

2.3 β 消除反应法(BEMAD)

BEMAD 法是利用 DTT 的解双键作用,选择性富集 O-GlcNAc 修饰的蛋白质,使其分子质量增加,准确鉴定 O-GlcNAc 修饰位点。由于 O-GlcNAc 糖苷键容易受到碱的影响产生 β 消除,丝氨酸和苏氨酸位点失去水分子,提供了修饰位点信息。BEMAD 法是指将蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基上的 O-GlcNAc 糖基化修饰在碱性条件下进行 β 消除反应,在 α 碳和侧链碳原子之间形成不饱和双键,然后与二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)发生米氏加成反应,它可以打开双键来标记被 β 消除的 O-GlcNAc 位点,同时,DTT 上的巯基可以与硫醇形成二硫键,常用于 O-GlcNAc 糖基化修饰多肽的富集和修饰位点的鉴定^[32]。但 O-GalNAc 等其他翻译后修饰也会发生 BEMAD 反应而产生假阳性,需要加入样品处理或者采用对照实验等方法以降低假阳性的影响。

2.4 硼酸法

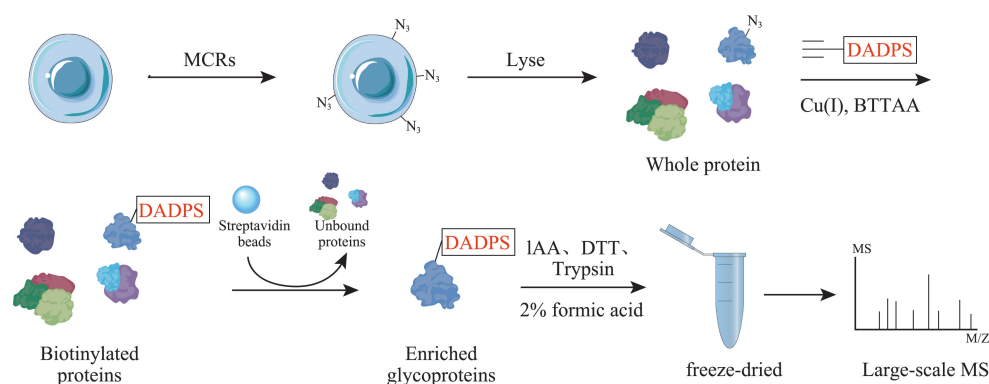
硼酸法被用于糖蛋白或糖肽富集,是因为它能够与含顺式二羟基的糖类(例如甘露糖、葡萄糖和半乳糖)发生共价且可逆的化学反应,进而形成稳定的五边形化合物。利用硼酸高亲和力可以捕获 N-糖肽和 O-糖肽,硼酸识别聚糖是非特异性的,即可以识别有各种分支的聚糖、线性聚糖以及单糖,便于样品分析。常用的硼酸化合物有 3-氨基苯硼酸(APBA)和 4-乙烯基苯硼酸(VPBA)。APBA 被包裹在磁性氧化铁纳米颗粒上,具有极好的结合能力和选择性,可选择性捕获糖蛋白^[33]。

2.5 胍化学法

在胍化学法中,聚糖的顺式二羟基被高碘酸盐氧化,然后与固定有胍基团的树脂发生共价偶联。糖蛋白的胍基捕获之后需要进行蛋白的水解消化、非糖肽的去除洗涤和利用 PNGase F 释放 N 聚糖。与凝集素亲和法相反,胍基捕获是非特异性的,可以富集所有糖缀合物。胍化学促进了糖蛋白组学,这种被称为“反向糖蛋白印迹”的方法也被用于富集 SGP,当富集 SGP 时,唾液化的糖蛋白被高碘酸盐氧化,捕获在胍珠上,后进行胰蛋白酶消化,并通过 SAs 的酸水解释放。基于胍化学的方法虽然具有较高的 SGP 富集选择性,但却丢失了末端 SAs 的信息^[34]。

2.6 代谢标记富集法

代谢标记法是指将具有叠氮基等特殊修饰基团的 GlcNAc 类似物,即代谢化学报告(Metabolic chemical reporters, MCRs)通过细胞培养进入代谢途径,转化成 UDP-GlcNAc 类似物,进而在糖基转移酶 OGT 的催化下发生 O-GlcNAc 糖基化修饰的过程(图 3),常用的代谢标记基团有酮基、叠氮基、巯基等。叠氮基可通过 Staudinger 反应与炔基发生特异性化学反应以引入生物素等,且叠氮基与炔基的反应特异性强,叠氮基团小,对代谢类似物稳定性的影响较小,从而得到广泛应用^[35]。代谢标记的一个限制是,它与内源性的 UDP-GlcNAc 合并竞争,对 UDP-GlcNAz 等类似物的利用率较低,代谢类似物在细胞代谢过程中可能标记其他糖修饰,产生假阳性^[36]。



注:含有叠氮基或炔基等生物正交基团的代谢化学报告基团(MCRs)处理细胞后,裂解物与可断裂生物素 DADPS 炔反应,然后进行链亲和素富集和胰蛋白酶消化,去除未修饰的肽后,释放所需的糖肽并收集用于 LC-MS/MS 分析。

Note: After treatment of cells with metabolic chemical reporters (MCRs) containing bioorthogonal groups such as azide or alkynyl groups, the lysates are reacted with the cleavable biotin DADPS alkyne, followed by streptavidin enrichment and tryptic digestion, and after removal of unmodified peptides, the desired glycopeptides are released and collected for LC-MS/MS analysis.

图 3 代谢标记富集 O-GlcNAc 糖修饰蛋白的流程

Fig. 3 Flow chart of metabolic labeling enrichment of O-GlcNAcylated proteins

2.7 亲水作用液相色谱法(Hydrophilic interaction chromatography, HILIC)

亲水作用液相色谱是一种传统的糖肽富集方法。该方法使用亲水材料(如胺、酰胺或齐聚物键合硅胶)来捕获连接在糖肽上的亲水糖链。这样,糖肽就可以以较高的特异性富集。为了尽可能排除大量 N-糖蛋白对 O-GlcNAc 糖基化肽富集和鉴定的干扰,在 O-GlcNAc 糖基化肽富集之前,应先用 PNGaseF 和 O-糖苷酶去除 N-聚糖和 O-聚糖^[37]。有报道称一种接枝一氧化氮基团的材料,可从天然蛋白质中对 O-GlcNAc 糖基化肽进行高亲和力富集,对来自 PNAC-1 细胞的 O-GlcNAc 糖基化蛋白进行了位点特异性分析,从 183 个糖蛋白中新发现了 197 个 O-GlcNAc 位点^[38]。此法可与凝集素亲和技术结合利用凝胶电泳进行糖肽的分离富集,这种方法利用了加入糖链可使其亲水性增强的原理^[39]。但此法无法区分肿瘤组织中含量很高的 O-GalNAc 糖基化蛋白,还需要进一步严格评估。

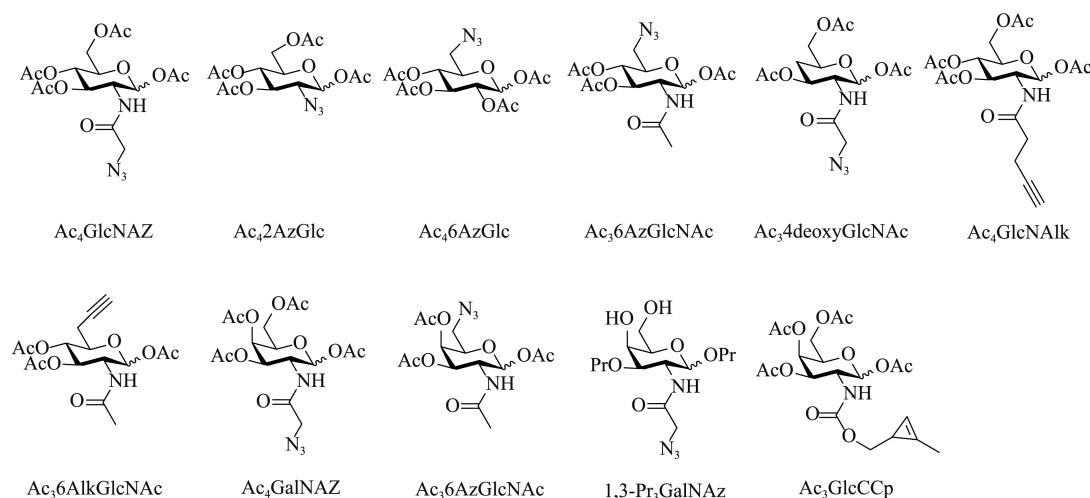


图 4 已报道的 HexNAc 类似物用于 O-GlcNAc 糖基化蛋白富集

Fig. 4 Reported HexNAc analogues for O-GlcNAcylated proteins enrichment

3 用于富集 O-GlcNAc 糖基化蛋白的 MCRs

MCRs 已被证明是一种利用功能探针在活细胞和各种生物体上标记聚糖的有效方法。其原理是通过生物正交官能团修饰的单糖类似物,如叠氮基或炔基,使其被细胞吸收,并通过救助途径酶转化为相应的核苷酸糖供体,最终并入多糖结构中^[40]。之后将通过生物正交反应与荧光染料或生物素反应,以实现 O-GlcNAc 糖基化

可视化或亲和纯化^[41]。下面将系统介绍近年来已报道的常用于 O-GlcNAc 糖基化蛋白富集和位点鉴定的 MCRs(图 4)。

3.1 GlcNAc 类似物

3.1.1 Ac₄GlcNAz: 由 Bertozzi 团队研究合成,是第一个被证明可以经 GlcNAc 挽救途径转化为 UDP-GlcNAz,通过 OGT 转运实现对目的蛋白的糖基化修饰。该探针的开发和应用为 O-GlcNAc 糖基化修饰的可视化鉴定提供了一个有效的工具,但是由于 GlcNAc 挽救途径中存在一个限速酶:UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶,致使 GlcNAz 代谢标记效率较低。受限于 GlcNAz 的标记效率,对其他 GlcNAc 类似物的研究也在不断推进^[42]。

3.1.2 Ac₄2AzGlc:Pratt 等开发了 2-叠氮-2-脱氧葡萄糖(2AzGlc),用过乙酰化的 Ac₄2AzGlc 处理细胞后,发现 2AzGlc 不标记细胞表面的糖蛋白,只标记细胞内的蛋白质和跨膜蛋白,由于不能受 OGA 调控动态地从蛋白质底物上去除,积累的高浓度 2AzGlc 对细胞有一定的毒性。2AzGlc 是第二个被表征为对 O-GlcNAc 糖基化修饰具有选择性的 MCR。并且进一步突出了 OGT 底物的多样性,2AzGlc 的研究对天然的非乙酰氨基葡萄糖单糖对细胞内修饰蛋白质标记具有重要的意义^[43]。

3.1.3 Ac₄6AzGlc:先前的研究表明除了 GlcNAc 外,OGT 还可以利用多种天然和非天然单糖对蛋白质进行酶修饰。为了研究细胞新陈代谢生物合成酶和糖基转移酶对不同糖的耐受性方面的作用,Partt 等开发了 6-叠氮-6-脱氧葡萄糖(6AzGlc)。研究表明 6AzGlc 处理细胞可以代谢标记 O-GlcNAc 修饰的细胞内蛋白质,值得注意的是 OGT 能够在体外接受 UDP-6AzGlc 作为底物,将 6AzGlc 转移至糖蛋白上,并且大部分是 O-连接的蛋白质。这种标记不依赖于 6AzGlc 到 6AzGlcNAc 的转换,因为敲除转换中负责决定效率步骤的酶 GFAT 不会导致标记的减少。6AzGlc 的研究开发对 OGT 作为除 UDP-GlcNAc 之外的多种糖基供体的代谢转化具有重要的意义,使得 MCRs 在糖蛋白分析中的应用更为广泛^[44]。

3.1.4 Ac₃6AzGlcNAc:Partt 等以 6AzGlcNAc 为基础合成了乙酰化的 GlcNAc 类似物 Ac₃6AzGlcNAc 并与多种哺乳动物细胞共同孵育。由于 6 位羟基被叠氮基取代,所以不能通过 GlcNAc 补救途径转化为 UDP 糖基供体,但研究发现当将正常底物 GlcNAc-6-磷酸添加到反应混合物中时,AGM1 能够将 6AzGlcNAc 磷酸化为 6AzGlcNAc-1-p,继而转化为 UDP-6AzGlcNAc。为了进一步研究 6AzGlcNAc 的特异性,用 6AzGlcNAc 进行标记富集蛋白质后,鉴定出不含外源添加到分泌途径中的聚糖(N-连接的或粘蛋白 O-连接的)修饰的细胞内蛋白质,这证实 6AzGlcNAc 对 O-GlcNAc 糖基化蛋白质具有高度特异性^[45]。

3.1.5 Ac₃4dGlcNAz: Peng George Wang 等开发合成了 1,3,6-三乙酰基-2-叠氮-2,4-双脱氧-D-吡喃葡萄糖(Ac₃4dGlcNAz),它可以通过 GalNAc 挽救途径,经 OGT 转移到细胞内蛋白质上。由于 C4 位缺少羟基,因此 Ac₃4dGlcNAz 比以前的探针具有更高的选择性。此外,O-4dGlcNAz 修饰对 OGA 具有较强的耐受性,大大提高了 Ac₃4dGlcNAz 的代谢标记效率。总而言之,该探针在标记、富集和鉴定细胞中的 O-GlcNAc 糖基化蛋白方面是一种更有效和更特异性的工具^[46]。

3.1.6 Ac₄GlcNAIk:GlcNAIk 是炔基基团修饰的 GlcNAc 类似物,Ac₄GlcNAIk 可以在低糖条件下成功地标记到蛋白质中。Pratt 等开发合成了 Ac₄GlcNAIk,研究表明 GlcNAIk 可以通过 GlcNAc 的补救途径。先前的研究证明 GlcNAz 可以代谢相互转化为 GalNAz,而 GlcNAIk 不能,进而能更专一的代谢标记 O-GlcNAc 糖基化蛋白。利用 GlcNAIk 标记后富集细胞糖蛋白,质谱鉴定出了 374 个蛋白质,其中 279 个是以前没有报道过的,同时验证了泛素连接酶 NEDD4-1 可以发生 O-GlcNAc 糖基化修饰,这是首次报道 NEDD4-1 的糖基化修饰^[47]。

3.1.7 Ac₃6AlkGlcNAc:Pratt 等开发了一种新型的探针 Ac₃6AlkGlcNAc,与之前报道过的 Ac₃6AzGlcNAc 相比,对细胞表面糖蛋白具有更高选择性且可在短时间内完成对 O-GlcNAc 糖基化蛋白质特异性标记。Ac₃6AlkGlcNAc 不能通过 GlcNAc 补救途径在细胞内代谢为 UDP-6AlkGlcNAc,但是与 Ac₃6AzGlcNAc 类似,磷酸乙酰葡萄糖氨变位酶能将 6AlkGlcNAc 磷酸化为 6AlkGlcNAc-1-p。同时也利用该探针在半胱天冬氨酸蛋白酶中鉴定出了 469 种 O-GlcNAc 糖基化蛋白,并且半胱天冬氨酸蛋白酶活性的调节与 O-GlcNAc 糖基化修饰有关,这种修饰在调节细胞的发育和疾病进程的程序性凋亡中发挥重要作用。因此,Ac₃6AlkGlcNAc 探针的应用使半胱天冬氨酸蛋白酶的 O-GlcNAc 糖基化可视化成为可能^[48]。

3.2 GalNAc 类似物

3.2.1 Ac₄GalNAz: Bertozzi 等开发研究了 N-叠氮乙酰半乳糖胺(GalNAz),利用 Ac₄GalNAz 对胞质和胞

核内的 O-GlcNAc 糖基化蛋白质进行代谢标记。它可以通过 GalNAz 补救途径产生 UDP-GalNAz,在 GALE 的作用下 UDP-GalNAz 转化为 UDP-GlcNAz。Ac₄GalNAz 同时经过 GalNAz 或 GlcNAz 挽救途径产生的多糖可能会使 Ac₄GalNAz 标记的细胞表面糖蛋白的研究复杂化。然而,从膜结合的粘蛋白类型糖蛋白中提纯核蛋白和细胞质蛋白可以对 O-GlcNAc 修饰本身进行特定的检测。这说明 Ac₄GalNAz 是对 O-GlcNAc 糖基化蛋白代谢标记强有力的 MCR。另外 GALE 可以调节细胞内 UDP-GalNAz 和 UDP-GlcNAz 的浓度,这可能表明 GALE 差向异构酶在细胞生理学中发挥了意想不到的作用,或许还能在疾病中发挥作用。因此,GALE 的动力学和细胞生物学特性将成为未来研究的一个有趣的课题^[49]。

3.2.2 Ac₃6AzGalNAc:J. Li 等报道了一种含有 C6 叠氮化合物的非天然单糖 Ac₃6AzGalNAc,研究发现它可以有效地标记多种细胞内蛋白质。与先前报道的 GlcNAz 和 GalNAz 探针相比,Ac₃6AzGalNAc 与 N-糖基蛋白/O-糖基蛋白的结合较少,表明它是一种更特异的 O-GlcNAc 修饰代谢探针,且具有很高的标记效率和特异性。此外,基于 LC-MS/MS 蛋白质组学分析,利用 Ac₃6AzGalNAc 鉴定出了 964 个蛋白质,包括许多重要的潜在 O-GlcNAc 底物。Ac₃6AzGalNAc 作为高效和特异的代谢探针,已经被用于 O-GlcNAc 糖基化蛋白的检测和鉴定,这将为 O-GlcNAc 糖基化修饰功能的研究提供新的思路^[50]。

3.2.3 1,3-Pr₂GalNAz:Hao 等报告了新一代非天然单糖,它可以被细胞高效率地吸收,更重要的是不会诱导非特异的 S-糖基化副反应。1,3-Ac₂GalNAz 和 1,3-Pr₂GalNAz 具有非常高的代谢标记效率,不会引起 S-糖基化修饰的同时也不具有细胞毒性,但研究发现 1,3-Pr₂GalNAz 比 1,3-Ac₂GalNAz 具有更高的特异性和效率,1,3-Pr₂GalNAz 是一种更好的新一代非天然糖的探针。该探针的发现为改善非天然糖标记物,避免 S-糖基化提供了无限可能^[51]。

3.2.4 Ac₄GalCCp:Patterson 通过将相应的氨基糖与活化的环丙烯(Cyclopropenes, CCp)单元直接结合,合成了所需的探针(Ac₄GalCCp)。实验发现环丙烯糖的功能与叠氮类探针相似,与 Ac₄GlcNAz 相比,Ac₄GalCCp 可以更好的靶向标记 O-GlcNAc 糖基化蛋白。近年来,环丙烯类化合物广泛应用于生物分子可视化和鉴定方面,并且环丙烯糖可以与叠氮化合物、炔类化合物同时使用,环丙烯探针的多功能性的研究将推动聚糖和相关生物分子的多组分成像实验技术的发展^[52]。

4 问题与展望

从 1983 年首次发现 O-GlcNAc 糖基化修饰以来,大量的研究证明 O-GlcNAc 糖基化影响细胞转录、信号分子传导和物质代谢等生命进程。很多重大疾病的发生发展与该修饰有密切联系。为了帮助检测 O-GlcNAc 修饰,人们研究的检测技术和非天然的小分子探针对 O-GlcNAc 糖基化蛋白的鉴定发挥了重大的作用。虽然现有的分子探针对 O-GlcNAc 糖基化标记已展现出良好的效率和特异性,但有些仍不能完全避免非特异性的干扰^[53]。未来需要更好的利用已报道的探针开发出更高效率和特异性的探针,以促进 O-GlcNAc 修饰的研究和应用。

尽管在过去的几年里对 O-GlcNAc 修饰的研究已经取得了很大的进展,但许多问题仍未得到解决。因此,研究更有效的化学功能基团与探针表位之间的生物正交反应,来检测低丰度的 O-GlcNAc 糖基化蛋白,对于病理相关蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化的生理功能和某些糖代谢途径中的相关酶的探索至关重要。关键蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰的检测作为治疗癌症靶点以及靶向药物的研发将为人类抗肿瘤提供强有力的支持^[54]。

参 考 文 献

- [1] MA J, HOU C, WU C. Demystifying the O-GlcNAc code: a systems view[J]. Chemical Reviews, 2022, 122(20): 15822-15864.
- [2] 王淳滨,楚俏,刘康,等. 小分子探针 2-叠氮乙酰氨基-1, 3, 4, 6-四乙酰基葡萄糖的合成[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2021, 34(5): 53-58.
- [3] WANG D, WU J, WANG D, et al. Cisplatin enhances protein O-GlcNAcylation by altering the activity of OGT, OGA and AMPK in human non-small cell lung cancer cells[J]. International Journal of Oncology, 2021, 58(6): 1-12.
- [4] DOS PASSOS JUNIOR R R, DE FREITAS R A, DELA JUSTINA V, et al. Protein O-GlcNAcylation as a nutrient sensor signaling placental dysfunction in hypertensive pregnancy[J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 1032499.
- [5] ZACHARA N E, AKIMOTO Y, BOYCE M, et al. The O-GlcNAc Modification[M]. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edi-

- tion, 2022.
- [6] ZHANG Y, QU Y, NIU T, et al. O-GlcNAc modification of Sp1 mediates hyperglycaemia-induced ICAM-1 up-regulation in endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(1): 79-84.
 - [7] TIAN Y, ZHU Q, SUN Z, et al. One-Step Enzymatic Labeling Reveals a Critical Role of O-GlcNAcylation in Cell-Cycle Progression and DNA Damage Response[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(50): 26128-26135.
 - [8] QIAN Z, LI C, ZHAO S, et al. Age-related elevation of O-GlcNAc causes meiotic arrest in male mice[J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9(1): 163.
 - [9] DE QUEIROZ R M, MOON S H, PRIVES C. O-GlcNAc transferase regulates p21 protein levels and cell proliferation through the FoxM1 - Skp2 axis in a p53-independent manner[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(9): 102289.
 - [10] LEVINE P M, BALANA A T, STURCHLER E, et al. O-GlcNAc engineering of GPCR peptide-agonists improves their stability and in vivo activity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(36): 14210-14219.
 - [11] FAHIE K M M, PAPANICOLAOU K N, ZACHARA N E. Integration of O-GlcNAc into stress response pathways[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3509.
 - [12] FAN J, GUO F, MO R, et al. O-GlcNAc transferase in astrocytes modulates depression-related stress susceptibility through glutamatergic synaptic transmission[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2023, 133(7): e160016. doi: 10.1172/JCI160016.
 - [13] LI Y, XIE M, MEN L, et al. O-GlcNAcylation in immunity and inflammation: An intricate system[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44(2): 363-374.
 - [14] MERLO L M F, PENG W, DUHADAWAY J B, et al. The immunomodulatory enzyme IDO2 mediates autoimmune arthritis through a nonenzymatic mechanism[J]. *The Journal of Immunology*, 2022, 208(3): 571-581.
 - [15] DONG H, LIU Z, WEN H. Protein O-GlcNAcylation regulates innate immune cell function[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 805018.
 - [16] JO R, SHIBATA H, KURIHARA I, et al. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-associated hypertension in diabetes mellitus: the role of O-GlcNAc modification[J]. *Hypertension Research*, 2023, 46(1): 19-31.
 - [17] CUI Y, CRUZ M, PALATNIK A, et al. O-GlcNAc transferase contributes to sex-specific placental deregulation in gestational diabetes [J]. *Placenta*, 2023, 131: 1-12.
 - [18] TIAN J L, HUANG C W, ESLAMI F, et al. Regulation of primary cilium length by O-GlcNAc during neuronal development in a human neuron model[J]. *Cells*, 2023, 12(11): 1520.
 - [19] KIM D Y, PARK J, HAN I O. Hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAc cycling of glucose metabolism in brain function and disease[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2023, 325(4): C981-C998.
 - [20] BURT R A, ALGHUSEN I M, JOHN EPHRAIME S, et al. Mapping the O-GlcNAc modified proteome: applications for health and disease[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 920727.
 - [21] NIE H, JU H, FAN J, et al. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth[J]. *Nature communications*, 2020, 11(1): 36.
 - [22] AYODEJI S A, BAO B, TESLOW E A, et al. Hyperglycemia and O-GlcNAc transferase activity drive a cancer stem cell pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Cell International*, 2023, 23(1): 1-18.
 - [23] LEE D H, KWON N E, LEE W J, et al. Increased O-GlcNAcylation of c-Myc promotes pre-B cell proliferation[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 158.
 - [24] CHEN Y, QIN H, YUE X, et al. Highly efficient enrichment of O-GlcNAc glycopeptides based on chemical oxidation and reversible hydrazide chemistry[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(49): 16618-16627.
 - [25] SAHA A, BELLO D, FERNANDEZ-TEJADA A. Advances in chemical probing of protein O-GlcNAc glycosylation: structural role and molecular mechanisms[J]. *Chemical Society reviews*, 2021, 50(18): 10451-10485.
 - [26] CHATHAM J C, ZHANG J, WENDE A R. Role of O-linked N-acetylglucosamine protein modification in cellular (patho) physiology [J]. *Physiological reviews*, 2021, 101(2): 427-493.
 - [27] KIM E J. Chemical reporters and their bioorthogonal reactions for labeling protein O-GlcNAcylation[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2411.
 - [28] LIU W, HANG G, YIN Y, et al. AANL (Agrocybe aegerita lectin 2) is a new facile tool to probe for O-GlcNAcylation[J]. *Glycobiology*, 2018, 28(6): 363-373.
 - [29] WULFF-FUENTES E, BERENDT R R, MASSMAN L, et al. The human O-GlcNAcome database and meta-analysis[J]. *Scientific data*, 2021, 8(1): 25.
 - [30] TIAN Y, ZHU Q, SUN Z, et al. One-Step Enzymatic Labeling Reveals a Critical Role of O-GlcNAcylation in Cell-Cycle Progression and DNA Damage Response[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(50): 26128-26135.
 - [31] CHEN Y, TANG F, QIN H, et al. Endo-M mediated chemoenzymatic approach enables reversible glycopeptide labeling for O-GlcNAcylation analysis[J]. *Angewandte Chemie*, 2022, 134(23): e202117849.
 - [32] ZHANG Y, SHEN B Q, QIN W J, et al. Glycoproteomics: structure, function and methods[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(4): 480-490. DOI: 10.13376/j. cbls/2018058.

- [33] LI J, ZHANG J, XU M, et al. Advances in glycopeptide enrichment methods for the analysis of protein glycosylation over the past decade[J]. *Journal of Separation Science*, 2022, 45(16): 3169-3186.
- [34] LI M, HUANG J, MA M, et al. Selective enrichment of sialylglycopeptides enabled by click chemistry and dynamic covalent exchange[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(18): 6681-6688.
- [35] YAMASHINA M, SUZUKI H, KISHIDA N, et al. Synthesis of Azaylide-Based Amphiphiles by the Staudinger Reaction[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(33): 17915-17919.
- [36] MAYNARD J C, CHALKLEY R J. Methods for enrichment and assignment of N-acetylglucosamine modification sites[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100031.
- [37] YOU X, QIN H, YE M. Recent advances in methods for the analysis of protein o-glycosylation at proteome level[J]. *Journal of separation science*, 2018, 41(1): 248-261.
- [38] WU C, SHI S, HOU C, et al. Design and Preparation of Novel Nitro-Oxide-Grafted Nanospheres with Enhanced Hydrogen Bonding Interaction for O-GlcNAc Analysis[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(42): 47482-47490.
- [39] HU W, ZHANG G, ZHOU Y, et al. Recent development of analytical methods for disease-specific protein O-GlcNAcylation[J]. *RSC advances*, 2023, 13(1): 264-280.
- [40] WANG J, CAO W, ZHANG W, et al. Ac34FGlcNAz is an effective metabolic chemical reporter for O-GlcNAcylated proteins with decreased S-glyco-modification[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2023, 131: 106139.
- [41] ZHENG L, CAO W, DOU B, et al. Ac36deoGlcNAz could selectively label O-GlcNAc modified proteins with minimal S-glyco-modification[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2023, 34(2): 107598.
- [42] BOYCE M, CARRICO I S, GANGULI A S, et al. Metabolic cross-talk allows labeling of O-linked β -N-acetylglucosamine-modified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(8): 3141-3146.
- [43] ZARO B W, BATT A R, CHUH K N, et al. The small molecule 2-azido-2-deoxy-glucose is a metabolic chemical reporter of O-GlcNAc modifications in mammalian cells, revealing an unexpected promiscuity of O-GlcNAc transferase[J]. *ACS chemical biology*, 2017, 12(3): 787-794.
- [44] DARABEDIAN N, GAO J, CHUH K N, et al. The metabolic chemical reporter 6-azido-6-deoxy-glucose further reveals the substrate promiscuity of O-GlcNAc transferase and catalyzes the discovery of intracellular protein modification by O-glucose[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(23): 7092-7100.
- [45] CHUH K N, BATT A R, ZARO B W, et al. The new chemical reporter 6-alkynyl-6-deoxy-GlcNAc reveals O-GlcNAc modification of the apoptotic caspases that can block the cleavage/activation of caspase-8[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(23): 7872-7885.
- [46] LI J, WANG J, WEN L, et al. An OGA-resistant probe allows specific visualization and accurate identification of O-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *ACS chemical biology*, 2016, 11(11): 3002-3006.
- [47] ZARO B W, YANG Y Y, HANG H C, et al. Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(20): 8146-8151.
- [48] AGARD N J, PRESCHER J A, BERTOZZI C R. A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(46): 15046-15047.
- [49] DARABEDIAN N, YANG B, DING R, et al. O-acetylated chemical reporters of glycosylation can display metabolism-dependent background labeling of proteins but are generally reliable tools for the identification of glycoproteins[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 318.
- [50] GUO J, ZHANG G, MA J, et al. Detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins using 6-azido-6-deoxy-N-acetyl-galactosamine[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(17): 4326-4334.
- [51] QIN K, ZHANG H, ZHAO Z, et al. Protein S-glyco-modification through an elimination - addition mechanism[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(20): 9382-9388.
- [52] PATTERSON D M, JONES K A, PRESCHER J A. Improved cyclopropene reporters for probing protein glycosylation[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(7): 1693-1697.
- [53] QIN W, QIN K E, ZHANG Y, et al. S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate[J]. *Nature chemical biology*, 2019, 15(10): 983-991.
- [54] PARKER M P, PETERSON K R, SLAWSON C. O-GlcNAcylation and O-GlcNAc cycling regulate gene transcription; emerging roles in cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(7): 1666.

(责任编辑:刘庆松)