

文章编号: 1004-0374(2011)06-0605-07

## N-糖基化位点鉴定方法和非经典N-糖基化序列

周 蕾, 顾建新\*

(复旦大学上海医学院, 卫生部糖复合物重点实验室, 上海 200032)

**摘要:** 蛋白质的 N-糖基化修饰是生物体调控蛋白质在组织和细胞中的定位、功能、活性、寿命和多样性的一种普遍的翻译后方式。N-糖基化位点是理解糖链功能的重要前提之一。应用新的糖蛋白、糖肽富集技术和质谱技术, 科学家们在不同组织中完成了对 N-糖基化位点的鉴定。此外, 不同于经典三联子的 N-糖基化序列的发现使人们对 N-糖基化过程的认识向纵深发展。

**关键词:** N-糖基化; 糖基化位点; 非经典序列

**中图分类号:** Q513.3      **文献标志码:** A

## N-glycosylation sites analysis and nonconsensus N-glycosylated sequences

ZHOU Lei, GU Jian-Xin\*

(Key Laboratory of Glycoconjugate Research, Ministry of Health; Shanghai Medical College, Fudan university, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** N-glycosylation of proteins is the most common post-translational modification, strongly influencing many of their location, function, activity, life span and diversity. Our knowledge to N-glycosylation sites is one of the most important prerequisites for detailed functional understanding. Using new methods based on glycoproteins/glycopeptides enrichment and mass spectrum techniques, scientists have been able to identify glycosylated sites in different tissues. Besides, the discovery of novel sequence patterns for N-glycosylation will help to understand the process of N-glycosylation better in future.

**Key words:** N-glycosylation; glycosylation sites; nonconsensus sequences

糖基化 (Glycosylation) 是指蛋白质或脂质在酶的作用下被连接上糖链的过程。作为生物体内最为重要的蛋白质翻译后修饰形式之一, 糖基化调控了蛋白质在组织和细胞中的定位、功能、活性、寿命和多样性<sup>[1-2]</sup>。细胞内超过 50% 的蛋白质都修饰有糖链, 它们参与了包括细胞识别、细胞分化、发育、信号转导、免疫应答等在内的各种重要的生命活动。在多种疾病, 如肿瘤、神经退行性疾病、心血管病、代谢性疾病、免疫性疾病及感染性疾病的发生发展中均伴随着蛋白质糖基化异常的发生<sup>[3-4]</sup>。因此, 针对糖链形成、糖链结构和糖链功能的糖生物学研究已成为当前生命科学不可忽视的领域。

区别于非酶糖化 (Glycation) 过程, 糖基化过程中糖链的连接需要在糖基转移酶的作用下完成, 同时还具有位点特异的性质。根据结合位点和结构的

差异, 糖链分为以下几种类型: (1) 连接于天冬酰胺 (Asparagine, Asn) 残基酰胺氮的 N-连接糖链; (2) 连接于丝氨酸 (Serine, Ser)、苏氨酸 (Threonine, Thr) 残基羟基氧的 O-连接糖链; (3) 与磷酸丝氨酸上的磷酸连接的糖链; (4) 连接于色氨酸 (Tryptophan, Trp) 残基上碳的 C-连接糖链 (很少见); (5) 糖基磷脂酰肌醇化。其中, N-连接糖链 (或称 N-糖基化) 在真核生物中广为存在, 也是研究最为深入的一种糖基化方式。

早在二十世纪六七十年代, N-连接糖链的生

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30930025, 31010103906)

\*通信作者: E-mail: jxgu@shmu.edu.cn

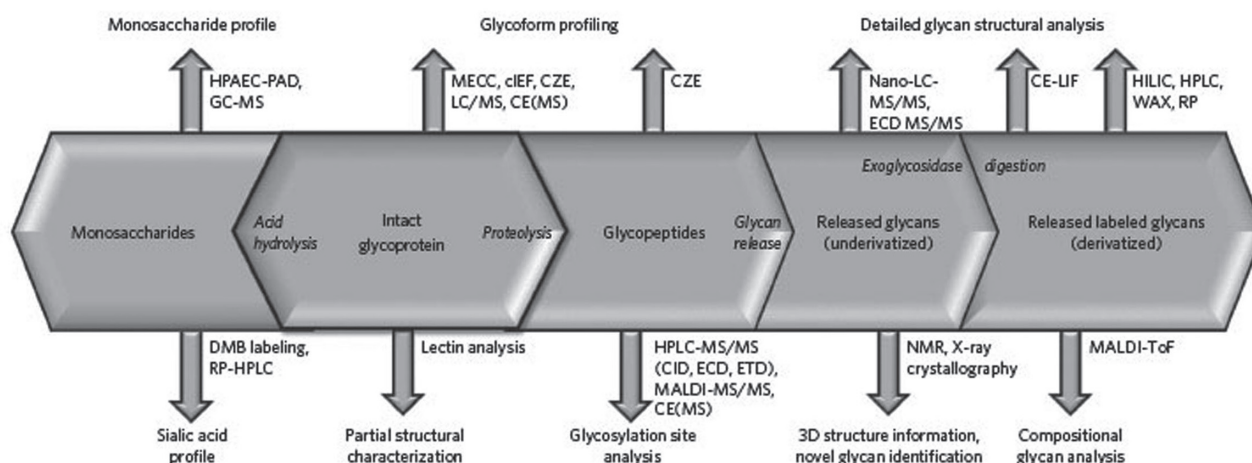
物合成过程就被阐明,这一过程在内质网中进行,最初是将一个 14 糖的脂连接前体寡糖添加到新生肽链的天冬酰胺上。在真核细胞中,启动 N-连接糖链合成的供体结构几乎是一致的,包括 3 个葡萄糖、9 个甘露糖和 2 个 N-乙酰氨基葡萄糖分子 ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ),而由于高尔基体中糖苷酶和糖基转移酶的作用,最终可以产生高甘露糖型、复合型和杂合型三个主要类别的 N-连接糖链。这些糖苷酶和糖基转移酶有限的专一性,要求它们在规定的顺序下发挥作用。而特定糖蛋白上出现的糖链结构,主要取决于合成该糖蛋白细胞中所表达的糖基转移酶。早期对 N-糖基化修饰肽链的研究表明,接纳体天冬酰胺周围所需的最小序列是  $\text{Asn-X-Thr/Ser}$ ,这里 X 是除了脯氨酸 (Proline, Pro) 之外的任何氨基酸。

不同于核酸和蛋白质,糖链的生物合成具有非模板性和结构的微观不均一性,一种给定的糖蛋白可以连接有多种不同的糖链形式而形成多种糖形。这一性质使糖蛋白具有了更多的分支结构、连接方式和空间构象,携带了更多的生物信息,行使着更为复杂的功能;然而,这种特性也给糖蛋白的分离和分析带来了重重困难。近年来,随着各种技术的兴起和发展,尤其是分离纯化技术、质谱技术、生物芯片技术的推进,糖链的富集和鉴定方法日趋成熟,针对糖基化位点、糖链结构开展各项研究成为可能。

## 1 N-糖基化位点分析方法

尽管 N-糖基化修饰有着重要的生物学功能和临床意义,我们当前对生物体内 N-糖链信息却还知之甚少。建立糖链结构和功能间的联系(功能糖组学),检测疾病诊断和预后相关的糖基化变化,阐明病原微生物感染过程的机制是当今糖生物学研究的热点问题<sup>[5-7]</sup>。总的来说,对糖基化的分析可以从以下几个方面来考量:(1)研究整体糖蛋白的糖链;(2)研究糖肽;(3)研究化学方法或酶法释放的糖链结构(图 1)<sup>[8]</sup>。此外,在选择进行糖基化分析的方法之前,还需要考虑以下一些因素:(1)所需的信息量;(2)优先考虑的是数据的质量还是数量;(3)有多少样品量可以提供<sup>[8]</sup>。在 N-糖基化相关的信息中,发生 N-糖基化的位点是我们理解其糖链功能的基础。除了传统生物化学中应用点突变等方法对糖基化位点进行研究,生物质谱技术也在 N-糖基化位点的鉴定中发挥了重要作用。

传统糖蛋白鉴定方法中,研究者往往通过凝胶电泳将糖蛋白混合物分离开来,应用酶联糖链特异抗体或凝集素通过化学发光法或过碘酸反应(periodic acid Schiff, PAS)染色来检测。糖蛋白随后经由多步色谱柱纯化,再应用自动 Edman 测序来测定糖基化位点<sup>[9]</sup>。尽管生物质谱技术的应用提高了分析的效率,应用这种方法大部分糖蛋白还是需要进行分析<sup>[10]</sup>。2006 年, Kaji 等<sup>[11]</sup>综合前人



HPAec-PAD, 含脉冲安培计的高效离子交换色谱; Mecc, 毛细管胶束电动色谱; cIeF, 毛细管等电聚焦; cZe, 毛细管区带电泳; MALDI-MS, 基质辅助激光解吸电离质谱; ce-IIF, 激光诱发荧光毛细管电泳; HILIC, 亲水作用色谱; WAX, 弱阴离子交换; rP, 反相; eSI-MS/MS, 电喷雾离子阱串联质谱; MALDI-toF, 基质辅助激光解析电离化/飞行时间质谱; cID, 碰撞诱导解离; etD, 电子转移解离; ecD, 电子获取解离。

图1 糖蛋白、糖肽和糖链研究的主要方法<sup>[8]</sup>

的方法, 提出了应用于大规模糖蛋白位点鉴定的方法——IGOT (isotope-coded glycosylation site-specific tagging)。如图 2 所示, 该方法由以下步骤组成: (1) 通过凝集素亲和层析, 抓取蛋白酶水解后的糖肽; (2) 通过疏水亲和层析纯化蛋白酶水解后的糖肽; (3) N-糖苷酶介导的糖基化位点的  $^{18}\text{O}$  掺入; (4) 通过液相色谱与质谱耦联的蛋白质组学技术, 鉴定被  $^{18}\text{O}$  标记的肽段。应用这一方法, 研究人员检测了秀丽隐杆线虫和小鼠肝脏的粗提取物, 在一周时间内就可以检测到数百至几千种糖蛋白, 并获得其糖基化位点<sup>[12]</sup>。随后的研究也陆续从组学的角度从不同组织中发现了数百种糖基化位点, 例如, 2009 年 Wollscheid 等<sup>[13]</sup>检测了免疫系统中细胞表面的糖蛋白 N-糖基化位点; Gundry 等<sup>[14]</sup>检测了鼠胚胎成纤维细胞中的糖蛋白的 N-糖基化位点; 人血浆、血清和唾液腺中糖蛋白的 N-糖基化位点也都被检测<sup>[15-16]</sup>。

2010 年, Zielinska 等<sup>[17]</sup>根据前人建立的“过滤辅助样品制备 (FASP)”方法<sup>[18]</sup>发展了新的糖肽富集方法, 可以更为高效地捕集包括膜蛋白在内的

糖蛋白 (图 3)。研究人员应用这一方法分析了鼠的 4 种组织和血浆, 发现了 2 352 种糖蛋白上的 6 367 个 N-糖基化位点, 这是迄今为止, 对 N-糖基化位点的分析中数据量最大的。

## 2 N-糖基化位点研究

### 2.1 经典N-糖基化位点研究

前人对 N-连接糖链的研究发现, 在蛋白质的一级结构中, 糖基化的天冬酰胺残基几乎固定不变地出现在三联子, 即 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 序列中, 其中 X 可以是除脯氨酸以外的任何氨基酸<sup>[19-20]</sup>。寡糖基转移酶 (OST) 复合物和多萜醇结合前体聚糖供体的结构和性质解释了 N-糖基化的发生对序列 C 端氨基酸残基的要求。对糖基化序列中 Asn 随后的 +2 位氨基酸的点突变研究表明氨基酸中氢受体 (hydrogen acceptor) 的存在对将多萜醇上的 Glac<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 连接到 Asn 的亲核取代反应是必需的<sup>[21,22]</sup>。研究人员对 N-糖基化基序进一步研究, 将 Asn+2 位氨基酸置换为 Thr 类似物。结果表明, OST 复合物既不能容忍 +2 位上 Thr 甲基基团的改

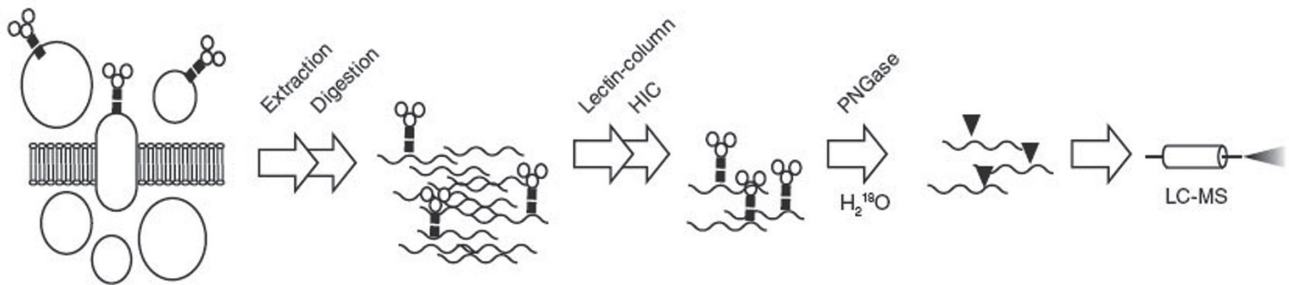
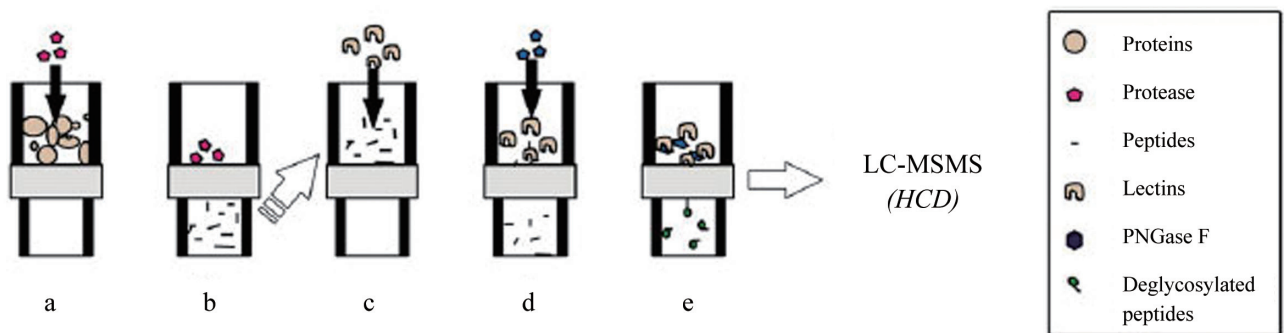


图2 通过IGOT-LC-MS/MS大规模鉴定N-糖基化位点的方法<sup>[11]</sup>



根据FASP操作方法处理全组织SDS-裂解液(a,b); 在过滤设备单元中加入可溶的凝集素富集糖肽(c); 经离心去除未与凝集素结合的肽, 同时用糖苷酶水解结合的肽(d); 从过滤装置上洗脱(e)。

图3 样品制备和N-糖基化肽段富集(N-Glyco-FASP), 标准30K过滤设备作为反应环境<sup>[17]</sup>



变,也不能容忍电荷的参与<sup>[23-24]</sup>。Asn+2位上如果是Thr,那么该序列发生N-糖基化的概率会更大<sup>[25-26]</sup>。此外,+1位上的氨基酸不是Pro也是N-糖基化发生的必要条件,这是由于Pro的环形结构会造成肽链骨架的刚性增加造成的<sup>[27]</sup>。研究发现,在OST的作用下,三联子序列的二级结构会发生改变,+1位的氨基酸的位置会远离Asn侧链氨基复合体和+2位Ser/Thr侧链的羟基。当三联子序列N端或C端存在半胱氨酸(Cysteine, Cys)时,由于二硫键的形成,使得构象的刚性增加,从而使N-糖链发生的概率降低<sup>[28]</sup>。

近年来,研究人员针对蛋白质数据库中已经确定发生N-糖基化修饰的Asn附近的氨基酸展开了研究,结果发现,Asn紧邻的前一位氨基酸是芳香族氨基酸或疏水氨基酸的可能性较大,而+1位和+3位分别是小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸的可能性较大。除了+1位完全没有和+3位可能性较小之外,Asn的邻近序列中常会发现Pro的存在。从结构的角度来看,连有糖链的Asn多出现在肽链转角或弯曲处<sup>[26,29]</sup>;进一步的研究发现,N-糖基化修饰发生与否,往往依赖于Asn侧链和+2位Ser/Thr侧链的羟基间的距离,两者相距约0.73Å时,最有可能在Asn上连接上糖链<sup>[30]</sup>。

尽管二级结构是考量三联子序列中Asn是否会发生N-糖基化的因素,但值得注意的是,在修饰发生的时候,蛋白质的结构尚未形成。在粗面内质网腔中,OST复合物会和核糖体60S亚基及转运通道蛋白Sec61形成三元复合物<sup>[31-32]</sup>。当新生肽链从核糖体多肽转移酶位(P位)上释放时,N-糖链会在内质网腔侧连接到Asn上<sup>[33]</sup>。新生肽链要穿过P位和OST复合物之间的Sec61蛋白转运通道,至少需要65到75个氨基酸残基的长度。这一相对较短的长度使得蛋白质的糖基化修饰实际上是一个共翻译过程,更确切地说是一个共转运过程<sup>[34-36]</sup>。翻译过程和N-糖基化修饰过程的同时发生,表明蛋白质的折叠并不影响某一特定位点上N-糖链的连接。事实上,前人的研究所反映的N-糖基化肽链的结构内涵,对理解糖基化基序在进化中的保守性有重要意义<sup>[26]</sup>;尽管如此,结构并非驱使糖基化过程发生的原因。

## 2.2 散在报道的非经典N-糖基化序列

Asn-X-Cys序列是最早被认识的非经典Asn-X-Ser/Thr基序的糖基化序列,最初发现于血浆蛋白C和von Willerbrand因子<sup>[37-38]</sup>。在随后的研究中,陆

续有一些存在N-糖基化修饰Asn-X-Cys序列的蛋白质被报道,包括人丝氨酸蛋白酶前体 $\alpha$ 、表皮生长因子受体、CD69蛋白、cathepsin B-like counter-defense蛋白等<sup>[38-42]</sup>。Bause和Legler<sup>[21]</sup>通过合成肽段的实验,推测Cys上的巯基基团(sulfhydryl group)可以替代Ser或Thr上的羟基基团。尽管如此,这一序列在模式生物中却很少见。Miletich和Broze<sup>[38]</sup>推测Asn-X-Cys序列只有在Cys残基尚未与其它Cys形成二硫键时才有发生糖基化的可能,因为一旦二硫键形成,则没有可以参与实现糖基化过程的巯基。

近年来,随着糖生物学分析技术,尤其是生物质谱技术的迅速发展,人们对N-糖基化位点的研究逐渐向纵深发展<sup>[8,17,43]</sup>。除了经典的三联子序列和Asn-X-Cys序列,一些新的糖基化位点也逐渐被报道。2009年,在波多黎各举行的第20届国际糖复合物会议上,顾建新等通过分子生物学手段提出在真核系统获得的重组人热休克蛋白60(Hsp60)上存在非经典的N-糖基化修饰位点。同年,Valliere-Douglass等<sup>[44]</sup>通过高效液相色谱和质谱分析等手段,首次验证并报道了人的单克隆抗体以及从病人血清中获得的抗体IgG1和IgG2的C<sub>H</sub>1恒定结构域上存在新的非经典N-糖基化序列TVSWN<sup>[62]</sup>SGAL。2010年,Valliere-Douglass等<sup>[45]</sup>对重组人源性抗体上发生的N-糖基化修饰展开了进一步的研究。通过酶解、凝集素富集、高敏感性质谱分析等技术手段,发现在重组人IgG2分子V<sub>L</sub>结构域上存在连接糖链的谷氨酰胺(Gln),存在于序列QGT中的106位Gln上连接有两天线的岩藻糖。除了糖基化的Gln之外,还有4个Asn位点:Asn-162、Asn-360、Asn-164和Asn-35发生了糖基化修饰,有趣的是,这些Asn也并不在经典的三联子序列Asn-X-Ser/Thr中。作者通过进一步的研究发现,这些Asn残基存在于“反向三联子序列”(Ser/Thr)-X-Asn中,而这可能与蛋白质的空间构象有关。这些结果表明,与我们以往的认知不同,N-糖基化过程可能会受到更多、更复杂的因素调控。

## 2.3 糖组学研究中的非经典N-糖基化序列

正如前文提到的,2010年,德国马克斯普朗克生物化学研究所的科学家利用一种新的方法,识别出了在不同组织中的6000余个糖基化蛋白位点,为更好地了解生命过程建立了重要的基本原理,相关研究结果发表于Cell杂志<sup>[17]</sup>。研究人员以过滤技术为基础,获得了从复杂生物样品中提取糖蛋白

的方法, 并将这种方法与高分辨率的质谱分析应用相结合, 在小鼠的组织样品中获得了 6 367 个 N-糖基化蛋白位点。相对于非糖基化蛋白而言, 在脊椎动物中, 这些糖蛋白具有更为高度的保守性。同时, 研究人员发现蛋白质上的 N-糖基化位点(至今未知)在阿尔茨海默氏症的发生和发展过程中发挥着重要作用。

值得一提的是, 研究人员在这一研究过程中, 对 N-糖基化位点也有了新认识。研究发现, N-糖基化修饰会偏向于发生在蛋白质表面的环状和转角结构处, 这一点与磷酸化和乙酰化修饰类似<sup>[46-47]</sup>。然而, 与磷酸化和乙酰化不同的是, N-糖基化修饰也会发生在  $\beta$  转角处, 这表明糖分子连接的共翻译过程比翻译后被激酶催化的磷酸化等过程更为稳定和严格。

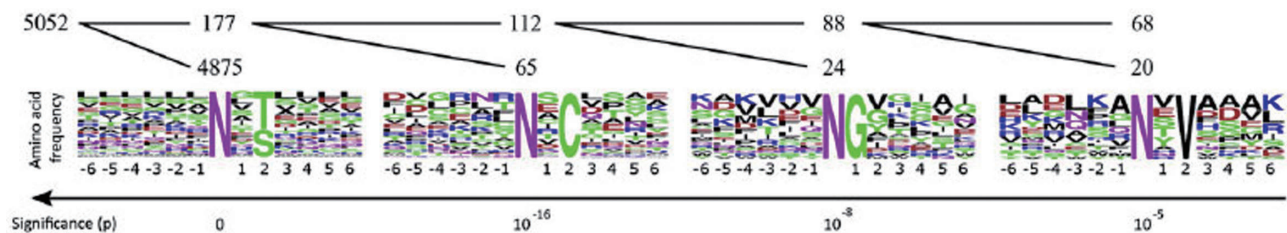
除了这种结构上的限制, 96.5% 的糖基化 Asn 都严格符合 Asn-X-Ser/Thr 基序(X 为 Pro 之外的任何氨基酸), 对糖基化基序进一步分析显示了更为严格的规律, 即 Asn+3 位的氨基酸也不能是 Pro, 这一现象曾也在秀丽线虫中被报道过<sup>[12]</sup>。正如前文中提到的非经典 N-糖基化序列, 如 Asn-X-Cys 在之前的研究中有散在的报道。研究发现 Asn-X-Cys 在小鼠的组织中分布广泛, 但是丰度很低, 只占到所有位点的 1.3%。此外, 研究还发现, 2.2% 的 N-糖基化位点既不是经典的三联子序列, 也不是 Asn-X-Cys; 这些序列在 Asn+2 富含缬氨酸 (Valine, Val) 或在 +1 位富含甘氨酸 (Glycine, Gly)(图 4)。糖基化的 Asn-Gly 和 Asn-X-Val 的分布都有统计学意义, 同时, 研究人员也通过 western blotting 等方法对部分位点作了进一步的验证。这一研究结果有力地证明了非经典的 N-糖基化位点的广泛存在, 为深入理解 N-糖基化的特性和发生机制提供了依据。

### 3 结语

作为一种生物信息分子, N-糖链参与了几乎所有的生命过程, 糖链的改变与疾病尤其是肿瘤、自身免疫性疾病、感染等重大疾病的发生、发展紧密相关。针对 N-糖链的研究有助于深入认识生命现象的本质, 阐明疾病发生机制, 以及为疾病的早期诊断和治疗提供指导。对 N-糖基化位点的认识是认识 N-糖链功能的重要前提, 随着色谱技术和质谱技术的发展, 大规模的 N-糖基化位点分析成为可能。非经典 N-糖基化基序的发现在某种意义上更新了我们对 N-糖基化的认识, 为我们认识和了解 N-糖基化的本质和发生过程打开了新的一页。

#### [参 考 文 献]

- [1] Parodi AJ. Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1426(2): 287-95
- [2] Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 21-50
- [3] Litynska A, Przybylo M, Pochec E, et al. Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 2001, 11(3): 205-12
- [4] Krishnan V, Bane SM, Kawle PD, et al. Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(1): 11-24
- [5] Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, et al. Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. *Traffic*, 2009, 10(11): 1569-78
- [6] Freeze HH, Aebi M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15(5): 490-8
- [7] Peracaula R, Barrabes S, Sarrats A, et al. Altered



最为常见的N-糖基化序列为经典三联子序列, +2位为Ser/Thr; 即Asn-X-Ser/Thr; 其次为非经典序列, 分别为Asn-X-Cys、Asn-Gly和Asn-X-Val。

图4 经典及非经典N-糖基化序列

- glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers*, 2008, 25(4-5): 207-18
- [8] Marino K, Bones J, Kattla JJ, et al. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*, 6(10): 713-23
- [9] Hirabayashi J, Hayama K, Kaji H, et al. Affinity capturing and gene assignment of soluble glycoproteins produced by the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem*, 2002, 132(1): 103-14
- [10] Gonzalez J, Takao T, Hori H, et al. A method for determination of N-glycosylation sites in glycoproteins by collision-induced dissociation analysis in fast atom bombardment mass spectrometry: identification of the positions of carbohydrate-linked asparagine in recombinant alpha-amylase by treatment with peptide-N-glycosidase F in 18O-labeled water. *Anal Biochem*, 1992, 205(1): 151-8
- [11] Kaji H, Yamauchi Y, Takahashi N, et al. Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 3019-27
- [12] Kaji H, Kamiie J, Kawakami H, et al. Proteomics reveals N-linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(12): 2100-9
- [13] Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(4): 378-86
- [14] Gundry RL, Raginski K, Tarasova Y, et al. The mouse C2C12 myoblast cell surface N-linked glycoproteome: identification, glycosite occupancy, and membrane orientation. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(11): 2555-69
- [15] Liu T, Qian WJ, Gritsenko MA, et al. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2005, 4(6): 2070-80
- [16] Sondej M, Denny PA, Xie Y, et al. Glycoprofiling of the human salivary proteome. *Clin Proteomics*, 2009, 5(1): 52-68
- [17] Zielinska DF, Gnad F, Wisniewski JR, et al. Precision mapping of an *in vivo* N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, 141(5): 897-907
- [18] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-62
- [19] Bause E, Hettkamp H. Primary structural requirements for N-glycosylation of peptides in rat liver. *FEBS Lett*, 1979, 108(2): 341-4
- [20] Marshall RD. The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochem Soc Symp*, 1974(40): 17-26
- [21] Bause E, Legler G. The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *Biochem J*, 1981, 195(3): 639-44
- [22] Silberstein S, Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J*, 1996, 10(8): 849-58
- [23] Bause E, Breuer W, Peters S. Investigation of the active site of oligosaccharyltransferase from pig liver using synthetic tripeptides as tools. *Biochem J*, 1995, 312 (Pt 3): 979-85
- [24] Breuer W, Klein RA, Hardt B, et al. Oligosaccharyltransferase is highly specific for the hydroxy amino acid in Asn-Xaa-Thr/Ser. *FEBS Lett*, 2001, 501(2-3): 106-10
- [25] Kasturi L, Eshleman JR, Wunner WH, et al. The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein. *J Biol Chem*, 1995, 270(24): 14756-61
- [26] Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, et al. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, 2004, 14(2): 103-14
- [27] Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J*, 1983, 209(2): 331-6
- [28] Bause E, Hettkamp H, Legler G. Conformational aspects of N-glycosylation of proteins. Studies with linear and cyclic peptides as probes. *Biochem J*, 1982, 203(3): 761-8
- [29] Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(12): 980
- [30] Petrescu AJ, Wormald MR, Dwek RA. Structural aspects of glycomes with a focus on N-glycosylation and glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(5): 600-7
- [31] Chavan M, Yan A, Lennarz WJ. Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 22917-24
- [32] Harada Y, Li H, Lennarz WJ. Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(17): 6945-9
- [33] Whitley P, Nilsson IM, von Heijne G. A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. *J Biol Chem*, 1996, 271(11): 6241-4
- [34] Glabe CG, Hanover JA, Lennarz WJ. Glycosylation of ovalbumin nascent chains. The spatial relationship between translation and glycosylation. *J Biol Chem*, 1980, 255(19): 9236-42
- [35] Kelleher DJ, Kreibich G, Gilmore R. Oligosaccharyltransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorins I and II and a 48 kd protein. *Cell*, 1992, 69(1): 55-65
- [36] Nilsson IM, von Heijne G. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 1993, 268(8): 5798-801
- [37] Titani K, Kumar S, Takio K, et al. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*, 1986, 25(11): 3171-84
- [38] Miletich JP, Broze GJ.  $\beta$  protein C is not glycosylated at

- asparagine 329. The rate of translation may influence the frequency of usage at asparagine-X-cysteine sites. *J Biol Chem*, 1990, 265(19): 11397-404
- [39] Chi YH, Koo YD, Dai SY, et al. N-glycosylation at non-canonical Asn-X-Cys sequence of an insect recombinant cathepsin B-like counter-defense protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 156(1): 40-7
- [40] Nakahara M, Koyama T, Nakazawa F, et al. Gradually glycosylated protein C mutants (Arg178Gln and Cys331Arg) are degraded by proteasome after mannose trimming. *Thromb Haemost*, 2004, 92(6): 1284-90
- [41] Sato C, Kim JH, Abe Y, et al. Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor. *J Biochem*, 2000, 127(1): 65-72
- [42] Vance BA, Wu W, Ribaldo RK, et al. Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-cys) glycosylation motifs. *J Biol Chem*, 1997, 272(37): 23117-22
- [43] An HJ, Peavy TR, Hedrick JL, et al. Determination of N-glycosylation sites and site heterogeneity in glycoproteins. *Anal Chem*, 2003, 75(20): 5628-37
- [44] Valliere-Douglass JF, Kodama P, Mujacic M, et al. Asparagine-linked oligosaccharides present on a non-consensus amino acid sequence in the C<sub>H</sub>1 domain of human antibodies. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32493-506
- [45] Valliere-Douglass JF, Eakin CM, Wallace A, et al. Glutamine-linked and non-consensus asparagine-linked oligosaccharides present in human recombinant antibodies define novel protein glycosylation motifs. *J Biol Chem*, 285(21): 16012-22
- [46] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 2009, 325(5942): 834-40
- [47] Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, et al. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(4): 697-707