

DOI: 10.13376/j.cbls/2017019

文章编号: 1004-0374(2017)02-0153-07

蛋白酪氨酸硫酸化修饰的研究进展

潘露露, 翟琳辉*, 谭敏佳

(中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203)

摘要: 无机硫酸盐与生物分子的结合在生物体系中具有重要的作用, 并且与疾病的发生直接相关。蛋白酪氨酸硫酸化 (protein tyrosine sulfation, PTS) 是一个普遍的翻译后修饰, 从其第一次被报道至今已有 50 余年。然而, 酪氨酸硫酸化在生理条件下的意义以及与疾病的关系在最近几年才逐渐受到关注。目前, 只有极少量的硫酸化蛋白质得以鉴定。现选择性地对蛋白酪氨酸硫酸化做一个简要的回顾, 并总结了基本的生物化学信息, 包括酪氨酸蛋白硫酸转移酶的制备、蛋白酪氨酸硫酸化的测定方法、蛋白酪氨酸硫酸化的生物学功能。这些信息是将来对蛋白酪氨酸硫酸化功能进一步探索的基础。

关键词: 蛋白质翻译后修饰; 蛋白酪氨酸硫酸化; 酪氨酸蛋白硫酸化酶; 生物学功能

中图分类号: Q517; Q5-33 **文献标志码:** A

Research progress on protein tyrosine sulfation

PAN Lu-Lu, ZHAI Lin-Hui*, TAN Min-Jia

(State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica,
Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China)

Abstract: The combination of inorganic sulfate and biological molecules plays a significant role in biological systems, which is directly related to the occurrence of diseases. Protein tyrosine sulfation (PTS) is a common post-translational modification which has been researched more than fifty years. However, the function of protein tyrosine sulfation and its relationship with the diseases begun to get attention in recent years. At present, only a small part of sulfated proteins has been identified. In this paper, we selectively make a brief review on protein tyrosine sulfation, including the preparation of tyrosylprotein sulfotransferase, the determination methods for protein tyrosine sulfation, and the biological functions of protein tyrosine sulfation. This knowledge is basic for the future exploration of the function of protein tyrosine sulfation.

Key words: post-translational modification; protein tyrosine sulfation; tyrosylprotein sulfotransferase; biological function

硫酸化是指无机硫酸盐在酶的催化下形成具有生物活性的有机硫酸化物的生化过程。无机硫酸盐形式的元素硫只有经过代谢活化后才能被生物利用 (图 1), 如活化的硫酸化合物 5'-腺苷磷酰硫酸 (adenosine-5'-phosphosulfate, APS) 和 3'-磷酰腺苷-5'-磷酰硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)。PAPS 的合成是由 ATP (adenosine triphosphate) 硫酸化酶和 APS 激酶两步催化而成。无机硫酸盐与 ATP 反应形成 APS 和焦磷酸盐; 紧接着, APS 与 ATP 反应形成 PAPS 和 ADP (adenosine diphosphate)。硫酸

转移酶家族负责将激活的硫酸基团从 PAPS 转移到各种生物分子, 如激素、神经递质、碳水化合物和蛋白质酪氨酸等的活性基团上。此外, APS 和 PAPS 也用于合成还原性的硫代谢物, 如许多蛋白质的成分——甲硫氨酸和半胱氨酸等。

收稿日期: 2016-08-17; 修回日期: 2016-09-18

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划(16YF-1414000); 国家自然科学基金项目(31370814); 上海市科学技术委员会项目(14DZ2261100)

*通信作者: E-mail: zhailinhui@simm.ac.cn

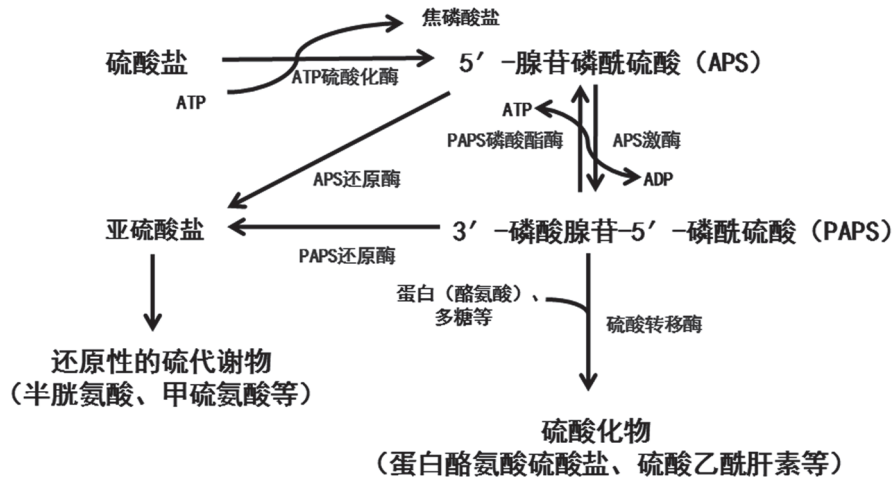


图1 无机硫酸盐的活化及其在生物体系中的同化作用

硫酸转移酶是催化生物硫酸化作用的酶，根据其细胞定位以及对直接底物的选择性，硫酸转移酶可以分为3个主要的家族：胞质硫酸转移酶、碳水化合物硫酸转移酶和酪氨酸蛋白硫酸转移酶 (tyrosylprotein sulfotransferase, TPST)。其中胞质硫酸转移酶具有水溶性，而碳水化合物硫酸转移酶和TPST是膜相关蛋白，水溶性较差。胞质硫酸转移酶具有催化多种化合物硫酸化的作用，包括激素和神经递质等内源性物质以及药物等外源性物质。胞质硫酸转移酶有非常广泛的底物特异性，主要选择酚类和醇类两种底物，因此，又分为芳基硫酸转移酶和羟甾类硫酸转移酶两类。膜相关的硫酸转移酶定位在反面高尔基体复合物中，可以分为碳水化合物硫酸转移酶和TPST两类。碳水化合物硫酸转移酶主要催化糖脂类、糖蛋白、蛋白聚糖等具有调节细胞交流功能的生物分子的硫酸化作用^[1]。TPST作为3个主要的硫酸转移酶家族中研究最少的一个，具有TPST1和TPST2两种亚型，在生物体内具有硫酸化蛋白酪氨酸的功能，是目前硫酸化研究领域的热点。因此，本文也重点对TPST的研究进行综述。

蛋白质酪氨酸硫酸化 (PTS) 是一种常见的翻译后修饰，是在酪氨酸蛋白硫酸化酶 (TPST) 的催化下，活化的硫酸基团从3'-磷酸腺苷-5'-磷酰硫酸向一些蛋白质和多肽的酪氨酸残基转移形成的。然而，其在生理条件下的意义及其与疾病的联系在最近几年才开始受到关注。TPST和酪氨酸硫酸化的蛋白质参与许多生理过程^[2]，包括止血、白细胞在血管内皮上的滚动、视觉功能、病毒进入细胞和一些配体与受体结合等。很多蛋白质经过酪氨酸硫酸化后

能被识别，从而参与蛋白质-蛋白质相互作用^[3]。到目前为止，被报道的蛋白酪氨酸硫酸化只有分泌蛋白和跨膜蛋白，还没有关于核蛋白和胞质蛋白的酪氨酸硫酸化修饰的报道。

1 酪氨酸蛋白硫酸转移酶的来源、制备、序列和特性

1.1 活性酪氨酸蛋白硫酸转移酶在生物体内的分布

各种细胞和组织中均存在具有活性的TPST，最初的研究是在大鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞溶解产物中证明了酪氨酸硫酸化的存在^[4]。之后，在大量的细胞系和组织中都鉴定到TPST的活性，包括哺乳动物组织，如牛肾上腺髓质和心脏，大鼠大脑、肝脏、胃黏膜和颌下唾液腺，人类的肝脏、胃黏膜、唾液和血小板等。研究人员通过实时逆转录PCR (polymerase chain reaction) 分析了各种人体组织 (肾上腺、骨髓、脑、结肠、心脏、肾、肝、肺、胰腺、外周白细胞、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、小肠、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管和子宫) 中TPST的水平^[5]，这些结果提供了人类TPST基因在不同组织中的表达信息。研究发现，高尔基体膜性小泡中TPST活性最高^[4]，酶的表面催化位点朝向高尔基腔内，并且和高尔基体膜密切相关。因此，许多研究工作将富集的高尔基体膜组分作为活性TPST的组织来源^[6]。

各种植物，包括地榆、水稻、胡萝卜、西红柿、烟草和拟南芥^[7]中也检测出具有活性的TPST。虽然植物和哺乳动物的TPST具有相似的酶活性，但序列相似性搜索没有发现任何同源性序列。

1.2 酪氨酸蛋白硫酸转移酶的制备和纯化

获得纯化的 TPST 对酪氨酸硫酸化的生物化学性质的研究至关重要。虽然在多种生物体内和组织中都观察到 TPST 的活性, 但其丰度非常有限, 并且 TPST 是一种膜蛋白, 所以需要先收集野生细胞或转基因细胞的高尔基体膜, 溶解膜蛋白以制备 TPST, 再通过目前有限的纯化方法, 通常是利用 TPST 抗体柱和其他亲和柱等处理方法获得纯化的 TPST (表 1)。

抗体柱主要是基于抗原抗体识别原理, 将 TPST 的抗体固定在固相载体上, 再特异性地对 TPST 蛋白进行富集。该类型的抗体柱可以用来纯化大鼠肝脏^[9]和颌下唾液腺^[10]中高尔基体膜上的 TPST, 也可以用于从人类唾液中纯化 TPST^[12]。另外, 研究人员开发了多种亲和和色谱柱, 其中, 底物多肽亲和柱可在 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸或其类似物 3',5'-二磷酸腺苷存在的情况下纯化 TPST。例如, 已知 α 微管蛋白具有一个公认的酪氨酸硫酸化位点, 欧洲分子生物学实验室的研究人员 Huttner 根据该区域的氨基酸序列, 设计合成出 11 个氨基酸的多肽 (KAALKDYEEV), 该合成肽段与 TPST 具有强的相互作用, 因此, 将此肽段固定于固相载体上作为纯化来源于牛肾上腺髓质的 TPST 的亲和柱^[8]; 类似地, 日本名古屋大学的 Matsubayashi 团队发现, 植物肽中含硫酸基的多肽 1 (PSY1) 前体 (pPSY1) 的 15 个氨基酸模板也可作为从拟南芥纯化 TPST 的亲和基质^[7]。

1.3 TPST 序列和结构分析

由于直接关于 TPST 生化特性测试和评估的实验和结果数据非常有限, 所以, 根据基因序列分析预测 TPST 酶的特性就显得十分必要, 而且通过对 TPST 基因序列的分析也可以间接揭示其重要的生化特性^[16]。例如, 人类 TPST 基因序列分析表明人类的 TPST 具有两个亚型, 分别是 TPST1 和 TPST2,

两者分别有 370 和 377 个氨基酸, 预测的相对分子质量分别是 4.22×10^4 和 4.19×10^4 ^[11]。人类 TPST1 和 TPST2 的氨基酸序列一致性高达 63%, 在预测的催化域残基处 (69~352) 更高 (77%)。两个亚型在预测的跨膜螺旋处 (残基 26~68) 的序列一致性明显较低。有趣的是, 在人类和其他哺乳动物中的同一种酶具有更高的序列一致性 (> 90%)。根据序列预测出 TPST1 和 TPST2 都具有 II 型跨膜拓扑结构、8 个残基的 C 端胞质区、17 个残基跨膜区和 1 个高尔基腔的催化结构域。通过序列和结构分析还发现, TPST 的每一个酶的腔内域有 2 个潜在的 N 端糖基化位点和 6 个保守的半胱氨酸残基形成的 3 个二硫键^[17]。此外, 植物 TPST 是 I 型跨膜蛋白, 与动物 TPST 没有丝毫序列相似性^[7]。这些信息也为进一步理解 TPST 作为酪氨酸硫酸化的生物催化剂的功能提供了基础知识。

2 蛋白酪氨酸硫酸化的检测

蛋白硫酸化和蛋白磷酸化具有极其相似的特点, 伴随着各种各样分析技术的出现, 蛋白质磷酸化在近几十年来得到了广泛的研究^[18]。然而, 由于蛋白酪氨酸硫酸化在生物体内具有更低的丰度, 且修饰的氨基酸残基种类较少, 因此只有有限的工具和方法可以用于蛋白酪氨酸硫酸化的研究, 与蛋白质磷酸化的检测方法形成鲜明对比^[19]。

2.1 蛋白酪氨酸硫酸化的检测方法

最常见的检测蛋白酪氨酸硫酸化的方法是将放射性同位素 ³⁵S 合成到底物蛋白或多肽中, 大多数先前报道的硫酸化的蛋白质都通过放射性标记得到证实。特异性针对硫酸化酪氨酸的单克隆抗体凭借着其高特异性和免疫印迹整合的简单性, 也可用于蛋白酪氨酸硫酸化的检测^[20]。2014 年, Zhou 等^[21]报道利用荧光方法对蛋白酪氨酸硫酸化进行检测。二维凝胶电泳技术在蛋白质组学研究中也是一种比

表1 蛋白酪氨酸硫酸转移酶的纯化

物种	制备来源	处理方法	参考文献
牛	肾上腺髓质	多肽亲和柱	[8]
大鼠	肝脏、颌下唾液腺	TPST 抗体柱	[9-10]
小鼠	HEK293-T 细胞	亲和柱	[11]
人	唾液	TPST 抗体柱	[12]
果蝇	大肠杆菌	亲和柱	[13]
拟南芥	酵母菌	多肽亲和柱	[7]
斑马鱼	COS-7 细胞	亲和柱	[14]
线虫	HEK293-T 细胞	亲和柱	[15]

较普遍用于样本预分离处理的技术,但已知的硫酸化蛋白为分泌型和跨膜型蛋白,而且膜蛋白的特点是具有疏水域,因此,在第一维度的等电电泳时容易受到沉淀和扰动的影响,从而干扰了它们被转移到第二维度的过程,因此,二维凝胶电泳(2DE)并没有应用到硫酸化蛋白质组学的研究中。目前,尽管质谱分析是研究蛋白质翻译后修饰最有力的工具,但是由于硫酸基团不管是在阴离子模式还是在阳离子模式的串联质谱(MS/MS)实验中都易分解发生中性丢失现象,而导致可能的假阴性结果;此外,由于硫酸化修饰基团(相对分子质量 79.9568)和磷酸化修饰基团(相对分子质量 79.9663)非常接近,仅相差 0.0095,利用常规的低分辨质谱很难区分硫酸化和磷酸化修饰。因此,将质谱技术应用于酪氨酸硫酸化研究仍然是一个挑战^[22]。加州大学旧金山分校的 Burlingame 实验室为区分硫酸化修饰和磷酸化修饰,采用了傅里叶变换磁滞谱这一超高分辨的质谱技术成功分辨出了硫酸化和磷酸化两种修饰类型,降低了质谱检测分析出现的假阳性^[23]。此外,利用抗体的特异性识别能力进行分析,也是对细胞内酪氨酸修饰位点加以验证和区分酪氨酸磷酸化修饰的主要手段。2016年,内布拉斯加大学生物工程系的 Guo 实验团队利用基因工程改造的 SH2 (Src Homology) 结构域识别硫酸化酪氨酸^[24]。针对已有的蛋白酪氨酸硫酸化修饰研究的方法,本文进

行了对比汇总,如表 2 所示。

2.2 蛋白酪氨酸硫酸化的预测方法

除了表 2 中的通过实验手段进行检测之外,蛋白质的硫酸化作用也可以通过生物信息学工具进行预测,这也是初步筛选潜在的蛋白质硫酸化作用位点的最为简单且有用的方法。目前有三个最便利的在线生物信息学分析工具: Sulfinator (<http://www.expasy.org/tools/sulfinator/>)^[27]、SulfoSite (<http://sulfosite.mbc.nctu.edu.tw/>)^[28] 和 PredSulSite (http://www.bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PredSulSite.aspx)^[29]。这些工具还结合了其他蛋白质属性,包括二级结构、氨基酸的理化性质和基于硫酸化蛋白质的数据集等,以此预测蛋白质硫酸化作用位点的氨基酸残基序列信息。由于受到蛋白酪氨酸硫酸化可用实验数据的限制,现有数据库的完整程度对于开发出高可靠性的预测方法是远远不够的,所以,目前仍然不能保证预测的靶蛋白在细胞中确实被硫酸化^[25]。然而,在当前阶段,在繁琐的实验过程之前,生物信息学分析仍然是初步预测潜在的硫酸化作用位点最简单的方法。

2.3 蛋白酪氨酸硫酸化的富集方法

硫酸化多肽和蛋白质的富集方法对于检测细胞内低水平的蛋白酪氨酸硫酸化具有非常关键的作用。由于硫酸化和磷酸化修饰基团在化学结构和化学性质上极其相似,所以,磷酸化多肽或蛋白质的

表2 蛋白酪氨酸硫酸化的检测方法

方法	检测目标	原理	优点	缺点	参考文献
放射性法	³⁵ S	放射性的 PAPS 为 ³⁵ SO ₃ 供体	高灵敏度	步骤繁琐	[25]
比色法	抗体	特异性抗体识别硫酸化蛋白	高通量	灵敏度低	[26]
荧光法	L-2,3-二氨基丙酸	酪氨酸硫酸化干扰了π-π共轭作用产生荧光	实时快速	低水平荧光不易检测	[21]
质谱法	质量变化	MS检测质量变化(-SO ₃)	高灵敏度	硫酸基团不稳定	[8]

富集技术也可广泛应用于多肽和蛋白质的硫酸化分析^[30-33],如固定化金属离子亲和色谱法(IMAC-Ga)。IMAC-Ga 的结构及其与硫酸化酪氨酸的相互作用如图 2 所示,但是这种方法对磷酸化的多肽也有富集作用^[30],从 IMAC-Ga 纯化的产品可以用超高分辨率的质谱方法进一步区分硫酸化和磷酸化化合物。俄克拉荷马大学健康科学研究中心的 Moore 实验室发现,针对硫酸化酪氨酸的单克隆抗体对于结合硫酸化的蛋白质具有较高的特异性,也可以用来富集和分离目标物^[20]。

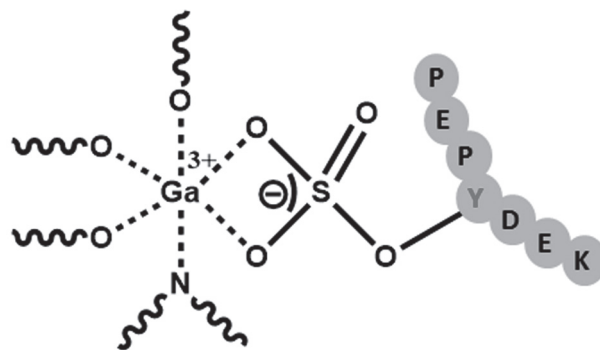


图2 固定化金属离子亲和色谱法(IMAC-Ga)富集硫酸的蛋白质或多肽

3 蛋白酪氨酸硫酸化的生物学功能

目前已知的酪氨酸硫酸化蛋白属于分泌、质膜和溶酶体蛋白质类,这也反映了它们在细胞内的定位。TPST 主要催化位于特定多肽序列上的酪氨酸的硫酸化,这涉及到多种至关重要的生理活动。已经报道的蛋白酪氨酸硫酸化的生物学功能包括调节细胞内转运过程和分泌蛋白的蛋白水解过程。同时,它也是通过硫酸化蛋白质的识别而参与细胞外蛋白质相互作用的关键调节器,从而调节激素水平、止血、炎症和一些传染病^[34]。蛋白酪氨酸硫酸化具体的生物学功能包括以下几点。

3.1 趋化因子受体作为蛋白酪氨酸硫酸化位点

趋化因子是小的分泌蛋白,它可以通过 G 蛋白偶联受体产生许多的生物学功能,包括白细胞转运、血管异常增生、血管正常再生、病毒感染的宿主免疫^[35]。一些趋化因子受体 (CCR5、CXCR4、CCR2B、CX3CR1 和 CXCR3) 也已被证明发生了硫酸化修饰^[36-40]。趋化因子受体 CCR5 的翻译后修饰是氨基端酪氨酸的硫酸化,该修饰有助于 HIV-1 gp120 与 CD4 复合物的结合,从而促进 HIV-1 进入表达 CCR5 和 CD4 的细胞。硫酸化酪氨酸残基突变为苯丙氨酸和氯酸盐可以降低 50%~75% 的艾滋病毒感染。这些信息表明,抑制 CCR5 的蛋白酪氨酸硫酸化可能为阻断 HIV-1 进入细胞的治疗药物的设计提供依据。2016 年,美国国立卫生研究院国家过敏症与传染病研究所合成了含有硫酸化酪氨酸的 CCR5 的多肽类似物,可以阻断 HIV-1 感染细胞的进程^[41]。

3.2 细胞黏附和免疫应答与蛋白酪氨酸硫酸化

PSGL-1 是在白细胞和内皮细胞上发现的一种具有 P 选择素高度亲和性的糖蛋白。PSGL-1 的 N 端携带 3 个潜在的酪氨酸硫酸化作用的位点。PSGL-1 上这些酪氨酸硫酸酯和特定聚糖是 P 选择素结合的决定因素。白细胞上的 PSGL-1 和内皮细胞上的 P 选择素的结合在炎症反应的白细胞黏附过程中至关重要^[42]。芳基硫酸酯酶处理后的 PSGL-1 释放了酪氨酸上的硫酸基团,降低了其结合 P 选择素的能力。因此,加州大学戴维斯医学院已将 TPST 作为治疗由慢性炎症引起的自身免疫性疾病的靶点,如类风湿性关节炎和多发性硬化症等^[43]。

与 EV71 感染有关的一些疾病与 PSGL-1 密切相关。EV71 毒株分为 EV71-PB 株 (PSGL-1 结合株) 和 EV71-非 PB 菌株 (PSGL-1 非结合株)。PSGL-1

的 N 端酪氨酸残基的硫酸化作用有助于 EV71-PB 株的衣壳蛋白 (VP1) 的结合^[44]。EV71-PB 毒株的感染可以导致脑炎、手足口病^[45]等。

3.3 止血和抗凝

蛋白酪氨酸硫酸化也参与了止血和抗凝的生物学过程,它在许多血浆蛋白的相互作用中至关重要,如水蛭素与凝血酶^[46]、纤连蛋白和纤维蛋白^[47]、凝血因子和血管性血友病因子 (vWF)^[48] 以及伴随 vWF 和凝血酶的糖蛋白 (GP) Iba^[49]。此外,血小板黏附是靠 vWF 作为桥梁连接皮下胶原蛋白和血小板膜蛋白 GP Iba 实现的。vWF 和 GP Iba 之间的结合取决于 3 个酪氨酸的硫酸化作用位点 (276、278 和 279)。水蛭素是由水蛭的唾液腺分泌的一种有效的抗凝蛋白,在抗凝治疗中,水蛭素酪氨酸 (位点 63) 的硫酸化使其与凝血酶的亲和力比未硫酸化的提高 10 倍,从而起到抗凝的作用^[46]。

4 展望

在生物学领域,膜蛋白和分泌蛋白硫酸化修饰的重要性是公认的,但是限于技术的发展,大部分蛋白酪氨酸硫酸化的生物学功能还是未知的。本文着重于蛋白硫酸化的生物化学研究方面,包括 TPST 的制备与纯化、蛋白酪氨酸硫酸化的测定方法、蛋白酪氨酸硫酸化可以引起的蛋白质-蛋白质相互作用以及随后的生物化学和生理学反应,因为这些是进一步理解其生物学作用的基础。尽管最近报道了一些蛋白酪氨酸硫酸化功能上的重大进展,但由于蛋白酪氨酸硫酸化检测技术的不足和检测手段的缺乏,有关蛋白酪氨酸硫酸化的许多问题还没有解决,比如 TPST 的特性、蛋白酪氨酸硫酸化的底物和反应机理等。未来随着生物大分子质谱技术的进一步发展,仪器的扫描速度、分辨率、灵敏度将进一步提升,能显著提高对蛋白酪氨酸硫酸化的鉴定深度和准确性。单晶衍射技术的提升也能进一步促进和提高对 TPST 家族成员结构的解析能力,从而为阐释 TPST 的作用机制的研究提供重要信息。同时,随着对酪氨酸磷酸化修饰研究的不断深入,以及实验数据的积累,进一步补充完善了现有的生物信息学分析数据库,这也提高了对蛋白酪氨酸硫酸化潜在靶点以及硫酸化修饰蛋白的生物功能的预测能力。此外,特异性更高的酪氨酸硫酸化抗体的开发和酪氨酸硫酸化修饰富集手段的不断改善,也为该类型翻译后修饰的深入研究提供了更强有力的支持。总之,对于探索新奇事物的化学家和生物学

家来说, 蛋白酪氨酸硫酸化作为一种广泛的蛋白质翻译后修饰, 是一个开放的和有吸引力的研究领域。其中, 硫酸化修饰蛋白及修饰位点鉴定解析、修饰蛋白的生物学功能、该类型修饰与其他蛋白质翻译后修饰的交互作用, 以及该类型修饰在疾病发生发展中的调控机制等将是未来硫酸化修饰的重要内容。随着对蛋白酪氨酸硫酸化研究的深入开展和不断创新, 加之分析仪器性能的提升、分析技术和手段的不断提高, 以及生物信息学数据库的不断完善, 酪氨酸硫酸化修饰的研究内容和潜在问题终将被逐渐解析, 其在生物体内的功能将会被更完整、深入地阐述和证明。

[参 考 文 献]

- [1] Bowman KG, Bertozzi CR. Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chem Biol*, 1999, 6: R9-R22
- [2] Yang YS, Wang CC, Chen BH, et al. Tyrosine sulfation as a protein post-translational modification. *Molecules*, 2015, 20: 2138-64
- [3] Kehoe JW, Bertozzi CR. Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol*, 2000, 7: R57-61
- [4] Lee RW, Huttner WB. Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J Biol Chem*, 1983, 258: 11326-34
- [5] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human carbohydrate sulfotransferase and tyrosylprotein sulfotransferase. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 821-5
- [6] Danan LM, Yu Z, Ludden PJ, et al. Catalytic mechanism of Golgi-resident human tyrosylprotein sulfotransferase-2: a mass spectrometry approach. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 1633-42
- [7] Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, et al. Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15067-72
- [8] Niehrs C, Huttner WB. Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBO J*, 1990, 9: 35-42
- [9] Ramaprasad P, Kasinathan C. Isolation of tyrosylprotein sulfotransferase from rat liver. *Gen Pharmacol*, 1998, 30: 555-9
- [10] William S, Ramaprasad P, Kasinathan C. Purification of tyrosylprotein sulfotransferase from rat submandibular salivary glands. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 338: 90-6
- [11] Ouyang YB, Moore KL. Molecular cloning and expression of human and mouse tyrosylprotein sulfotransferase-2 and a tyrosylprotein sulfotransferase homologue in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 1998, 273: 24770-4
- [12] Kasinathan C, Ramaprasad P, Sundaram P. Identification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase from human saliva. *Int J Biol Sci*, 2005, 1: 141-5
- [13] Chen BH, Wang CC, Lu LY, et al. Fluorescence assay for protein post-translational tyrosine sulfation. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 1425-9
- [14] Mishiro E, Liu MY, Sakakibara Y, et al. Zebrafish tyrosylprotein sulfotransferase: molecular cloning, expression, and functional characterization. *Biochem Cell Biol*, 2004, 82: 295-303
- [15] Kim TH, Kim DH, Nam HW, et al. Tyrosylprotein sulfotransferase regulates collagen secretion in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*, 2010, 29: 413-8
- [16] Stone MJ, Chuang S, Hou X, et al. Tyrosine sulfation: an increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins. *N Biotechnol*, 2009, 25: 299-317
- [17] Mishiro E, Sakakibara Y, Liu MC, et al. Differential enzymatic characteristics and tissue-specific expression of human TPST-1 and TPST-2. *J Biochem*, 2006, 140: 731-7
- [18] Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics*, 2011, 8: 81-94
- [19] Monigatti F, Hekking B, Steen H. Protein sulfation analysis--A primer. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764: 1904-13
- [20] Hoffhines AJ, Damoc E, Bridges KG, et al. Detection and purification of tyrosine-sulfated proteins using a novel anti-sulfotyrosine monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 2006, 281: 37877-87
- [21] Zhou W, Duckworth BP, Geraghty RJ. Fluorescent peptide sensors for tyrosylprotein sulfotransferase activity. *Anal Biochem*, 2014, 461: 1-6
- [22] Salek M, Costagliola S, Lehmann WD. Protein tyrosine-O-sulfation analysis by exhaustive product ion scanning with minimum collision offset in a NanoESI Q-TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem*, 2004, 76: 5136-42
- [23] Medzihradsky KF, Darula Z, Perlson E, et al. O-sulfonation of serine and threonine: mass spectrometric detection and characterization of a new posttranslational modification in diverse proteins throughout the eukaryotes. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 429-40
- [24] Ju T, Niu W, Guo J. Evolution of src homology 2 (SH2) domain to recognize sulfotyrosine. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 2551-7
- [25] Liu TA, Yasuda S, Williams FE, et al. A target-specific approach for the identification of tyrosine-sulfated hemostatic proteins. *Anal Biochem*, 2009, 390: 88-90
- [26] Lassen KS, Bradbury AR, Rehfeld JF, et al. Microscale characterization of the binding specificity and affinity of a monoclonal antisulfotyrosyl IgG antibody. *Electrophoresis*, 2008, 29: 2557-64
- [27] Monigatti F, Gasteiger E, Bairoch A, et al. The Sulfinator: predicting tyrosine sulfation sites in protein sequences. *Bioinformatics*, 2002, 18: 769-7
- [28] Chang WC, Lee TY, Shien DM, et al. Incorporating support vector machine for identifying protein tyrosine sulfation sites. *J Comput Chem*, 2009, 30: 2526-37

- [29] Huang SY, Shi SP, Qiu JD, et al. PredSulSite: prediction of protein tyrosine sulfation sites with multiple features and analysis. *Anal Biochem*, 2012, 428: 16-23
- [30] Cantin GT, Yi W, Lu B, et al. Combining protein-based IMAC, peptide-based IMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis. *J Proteome Res*, 2008, 7: 1346-51
- [31] Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 94-101
- [32] Villen J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1630-8
- [33] Ye J, Zhang X, Young C, et al. Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J Proteome Res*, 2010, 9: 3561-73
- [34] Seibert C, Sakmar TP. Toward a framework for sulfoproteomics: synthesis and characterization of sulfotyrosine-containing peptides. *Biopolymers*, 2008, 90: 459-77
- [35] Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol*, 1999, 19: 1-47
- [36] Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, et al. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, 1999, 96: 667-76
- [37] Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, et al. The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 α association and HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 2002, 277: 29484-9
- [38] Preobrazhensky AA, Dragan S, Kawano T, et al. Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region. *J Immunol*, 2000, 165: 5295-303
- [39] Fong AM, Alam SM, Imai T, et al. CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19418-23
- [40] Colvin RA, Campanella GS, Manice LA, et al. CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 5838-49
- [41] Cimbri R, Peterson FC, Liu Q, et al. Tyrosine-sulfated V2 peptides inhibit HIV-1 infection via coreceptor mimicry. *EBioMed*, 2016, 10: 45-54
- [42] Pouyani T, Seed B. PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*, 1995, 83: 333-43
- [43] Hsu W, Rosenquist GL, Ansari AA, et al. Autoimmunity and tyrosine sulfation. *Autoimmun Rev*, 2005, 4: 429-35
- [44] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med*, 2009, 1: 794-7
- [45] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001174
- [46] Stone SR, Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, 1986, 25: 4622-8
- [47] Suiko M, Liu MC. Change in binding affinities of 3Y1 secreted fibronectin upon desulfation of tyrosine-O-sulfate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 154: 1094-8
- [48] Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem*, 1991, 266: 740-6
- [49] Dong J, Ye P, Schade AJ, et al. Tyrosine sulfation of glycoprotein I(b) α . Role of electrostatic interactions in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem*, 2001, 276: 16690-4