

УДК 581.1

N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

© 2024 г. И. А. Ларская^{а,*}, Е. О. Федина^а, П. В. Микшина^а, Т. А. Горшкова^{а,б}^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия^бИнститут физиологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: pzl@mail.ru

Поступила в редакцию 21.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

N-гликозилирование является одной из самых распространенных и наиболее сложной среди посттрансляционных модификаций белков, которая играет ключевую роль в их укладке, контроле качества и деградации, а также оказывает влияние на активность, транспорт, локализацию и взаимодействие с другими белками. Более того, *N*-гликозилирование модулирует многие важные биологические процессы, включая рост, развитие, морфогенез, и участвует в процессах передачи стрессовых сигналов. При этом если роль *N*-гликозилирования в целом и функции отдельных *N*-гликанов на клетках млекопитающих хорошо изучены, исследования этого процесса в растениях значительно отстают. В обзоре обобщена имеющаяся информация о процессе *N*-гликозилирования белков, описан путь биосинтеза и функции различных *N*-гликанов в растениях в контексте роста, развития и влияния внешних факторов. Делается акцент на основных моментах, которые необходимо учитывать при исследовании этого процесса в растениях и обсуждаются возможности практического использования полученных знаний для гликоинжиниринга растительных белков.

Ключевые слова: аппарат Гольджи, мутанты, растения, рост, стресс, ферменты процессинга *N*-гликанов, эндоплазматический ретикулум, *N*-гликозилирование

DOI: 10.31857/S0015330324020036, EDN: OBVBUR

ВВЕДЕНИЕ

Функциональные особенности белков в значительной степени определяются ко-/посттрансляционными модификациями, влияющими на их активность, транспорт, локализацию, взаимодействие с другими белками, что в свою очередь, находит отражение в изменении фенотипа организмов и в их способности адаптироваться к условиям окружающей среды [1, 2]. Регулярно пополняемый список включает более двухсот различных посттрансляционных модификаций белков растений, которые могут быть как широко распространенными, так и редкими, вплоть до уникальных [3]. Считается, что ферментативное гликозилирование (присоединение углеводных фрагментов к молекуле белка) является одной из самых распространенных и при этом наиболее сложной из всех посттрансляционных модификаций. Связанные с белками гликаны представляют собой разнообразные олигосахаридные структуры, синтез которых обеспечивается сложным ферментативным механизмом, опосредуемым, по меньшей мере, более чем 250 генами, охарактеризованными на сегодняшний день [4, 5]. Эта модификация

включает *O*-гликозилирование и *N*-гликозилирование, в зависимости от типа связи и места присоединения гликана [3]. *N*-гликаны связываются с цепью белка через амидную связь с остатком аспарагина в мотиве Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Эта аминокислотная последовательность в молекуле белка, по которой происходит присоединение гликанов при *N*-гликозилировании, получила название секвона. Было показано, что аминокислота в положении X, а также аминокислота, следующая за мотивом Asn-X-Ser/Thr, важна для эффективного *N*-гликозилирования [6, 7]. *O*-гликаны в растениях связываются с белками преимущественно через гидроксильную группу гидроксипролина, серина и реже — треонина (рис. 1).

N-связанные гликаны играют весомую роль в функционировании растительных организмов и считаются необходимыми для изменения физико-химических свойств и определения биологических функций белков [5]. Они участвуют в фолдинге белков и регуляции контроля качества в эндоплазматическом ретикулуме, стабилизируют их от денатурации и протеоли-

ЭТАПЫ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ. ТИПЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ N-ГЛИКАНОВ

N-гликозилирование белков — это высококонсервативный процесс, основанный на последовательных и хорошо скоординированных реакциях, которые, в основном, имеют место в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [11, 20]. Поэтапная сборка прикрепляемого к белку гликана инициируется на цитоплазматической и продолжается на люменальной поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума с помощью множества специфических гликозилтрансфераз (ALG — asparagine-linked glycosylation) (рис. 2а), что приводит к образованию олигосахаридного предшественника, связанного с долихолфосфатом ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$). Собственно, процесс N-гликозилирования белков начинается с переноса этого олигосахаридного предшественника с липидного носителя на сайты N-гликозилирования синтезируемых белков с помощью олигосахарилтрансферазного комплекса (OST), распознающего кон-

кретную аминокислотную последовательность (Asn-X-Ser/Thr , где X — любая аминокислота, кроме пролина). В эндоплазматическом ретикулуме N-гликаны последовательно обрезаются α -глюкозидазами I и II до моноглюкозидного состояния, что позволяет ему вступить в цикл контроля качества ЭПР, где при связывании с шаперонами эндоплазматического ретикулума — кальнексином (CNX) и кальретикулином (CRT) происходит сворачивание белковой молекулы и распознавание несвернутых или неправильно свернутых белков, которые могут повторно входить в цикл для рефолдинга (рис. 2а). Если это не удастся, белки с неправильной укладкой перемещаются для эндоплазматический ретикулум-ассоциированной деградации (ERAD — Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation). У правильно свернутого гликопротеина маннозидаза (MNS3), локализованная в эндоплазматическом ретикулуме, удаляет один остаток маннозы, чтобы получить структуру $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, способную транспортироваться в аппарат Гольджи. Эта часть био-

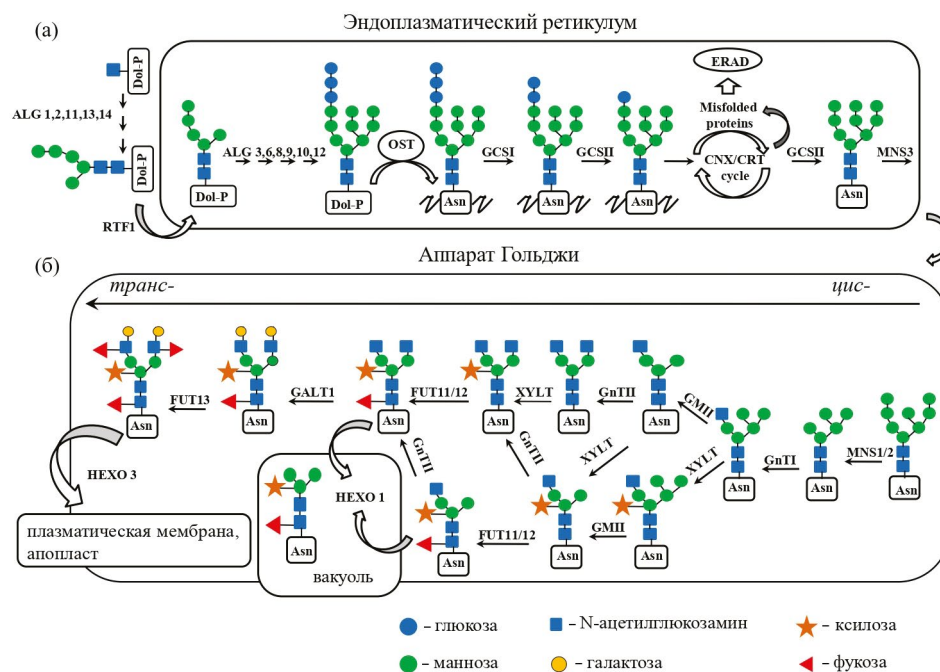


Рис. 2. Схематическое изображение основных этапов процесса N-гликозилирования растений и созревания N-гликанов в эндоплазматическом ретикулуме (а) и аппарате Гольджи (б). Схема составлена с использованием основных этапов и ферментов процессинга на основе материалов, предложенных Nagashima et al. [5] и Strasser [20] с собственными модификациями.

Обозначения: DolP — долихолфосфат; Asn — аспаргин; OST — мультисубъединичный олигосахарилтрансферазный комплекс; CNX — кальнексин; CRT — кальретикулин.

Ферменты, участвующие в формировании N-гликанов: ALG (Asn-linked glycosylation) — ферменты, катализирующие сборку долихолпирофосфат-связанного олигосахарина; RTF1 — флиппаза; GCSI — α -глюкозидаза I; GCSII — α -глюкозидаза II; MNS3 — α -маннозидаза I эндоплазматического ретикулума; MNS1/2 — α -маннозидаза I аппарата Гольджи; GnT1 — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза I; GnTII — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза II; GMII — α -маннозидаза II аппарата Гольджи; XYLT — β -1,2-ксилозилтрансфераза; FUT11/12 — коровья α -1,3-фукозилтрансфераза; FUT13 — α -1,4-фукозилтрансфераза; GALT1 — β -1,3-галактозилтрансфераза 1; HEXO1 — N-ацетилгексаминозидаза 1; HEXO 3 — N-ацетилгексаминозидаза 3.

синтетического пути является одинаковой во всех эукариотических клетках, и конечным результатом этого этапа являются *N*-гликаны с высоким содержанием маннозы [21].

Покинув эндоплазматический ретикулум, высокоманнозные растительные *N*-гликаны далее могут быть преобразованы в сложные или гибридные при прохождении из цис-цистерн через медиальные в транс-цистерны аппарата Гольджи (рис. 26). В это время благодаря действию различных гликозидаз и гликозилтрансфераз происходит удаление остатков маннозы и последовательное добавление специфических углеводных остатков [11, 20]. Сигналом для инициации образования сложных гликанов является присоединение с помощью *N*-ацетилглюкозаминтрансферазы I (GNTI) хотя бы одного концевых остатка *N*-глюкозамина (GlcNAc) к α -1,3-маннозной ветви олигосахарида с высоким содержанием маннозы ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$). Это является также предпосылкой для последующей модификации, а именно — удаления остатков маннозы и присоединения второго концевых остатка GlcNAc с помощью *N*-ацетилглюкозаминтрансферазы II (GNTII) на α -1,6-маннозную ветвь. В случае *N*-гликанов гибридного типа модификации происходят только по α -1,3-маннозной ветви, в то время как α -1,6-маннозная ветвь сохраняет свои остатки маннозы. На этой же стадии может происходить α -1,3-фукозилирование и β -1,2-ксилозилирование корового гликана ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), образуя специфические для растений *N*-гликаны [20]. Необходимым условием для переноса α -1,3-фукозы и β -1,2-ксилозы является наличие, по крайней мере, одного терминального GlcNAc [23]. Идентификация растительных *N*-гликанов, содержащих либо α -1,3-фукозу, либо β -1,2-ксилозу показала, что эти две модификации не коррелируют между собой и являются полностью независимыми событиями [22].

Далее часть сложных *N*-гликанов подвергается модификациям в транс-сети аппарата Гольджи путем прикрепления β -1,3-галактозы и α -1,4-фукозы, что приводит к образованию структур Льюиса А (Le^a -type) [24]. Помимо аппарата Гольджи, где они формируются, Le^a -структуры могут быть локализованы на клеточной поверхности [25] или присутствовать на гликопротеинах, секретируемых клетками растений [26].

После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи *N*-гликаны сложного типа могут быть дополнительно модифицированы во время транспорта гликопротеина в конечный пункт назначения. На примере *A. thaliana* было показано, что специфическое отщепление концевых остатков GlcNAc в вакуолях и плазмалемме осуществляет β -*N*-ацетил-

гексозаминидаза 1 (HEXO1) и β -*N*-ацетилгексозаминидаза 3 (HEXO3), соответственно [27]. В результате образуется отдельный тип *N*-гликанов — усеченные или низкоманнозные (paucimannosidic type). Долгое время этот тип гликанов, обнаруживаемых на вакуолярных и секретируемых гликопротеинах, считался уникальным для беспозвоночных животных и растений [28].

Таким образом, процессинг *N*-гликанов в растениях приводит к образованию нескольких типов гликанов, которые в зависимости от углеводных остатков, присоединенных к общей структуре ядра ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), можно подразделить на высокоманнозные, сложные и гибридные. Высокоманнозные гликаны содержат только остатки маннозы (от двух до шести), присоединенные к коровому олигосахариду [21]. Гликианы с высоким содержанием маннозы в растениях аналогичны гликанам, обнаруженным в клетках млекопитающих. Группа гликанов сложного типа, несущих остатки GlcNAc на своих антеннах, более разнообразна и представлена в растениях двухантенными формами, тогда как у млекопитающих *N*-гликаны этого типа могут быть более разветвленными [4]. Зрелые растительные гликаны сложного типа несут β -1,2-связанные остатки ксилозы и α -1,3-связанные остатки фукозы, присоединенные к коровому олигосахариду $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Эта структура считается типичной растительной гликоформой и присутствует во всех проанализированных видах растений [29]. Для других видов сложных гликанов используют специфические названия. Так, например, Le^a -содержащие гликаны — это гликаны с терминальным трисахаридом ($\text{Fuc}\alpha 1,4(\text{Gal}\beta 1,3)\text{GlcNAc}$), так называемой структурой Льюиса А [24]. Многие растительные *N*-гликаны сложного типа утрачивают концевые остатки GlcNAc на невозстанавливаемых концах [30–32] и относятся к отдельному типу низкоманнозных *N*-гликанов (рис. 3). Гликианы гибридного типа — это гликаны, у которых на концевых антеннах присутствуют как остатки GlcNAc, так и остатки маннозы. В целом около 90% составляют две гликоформы: гликаны сложного типа (до 60%) с β -1,2-связанными остатками ксилозы и α -1,3-связанными остатками фукозы и гликаны с высоким содержанием маннозы (до 20–40%). Другие гликоформы составляют в сумме обычно не более 20% [33].

В целом, анализ данных литературы создает впечатление достаточно хорошей изученности процесса *N*-гликозилирования в растениях, поскольку к настоящему моменту установлены основные этапы созревания *N*-гликанов [4], охарактеризованы ключевые игроки данного процесса [21] и выявлены основные типы гли-

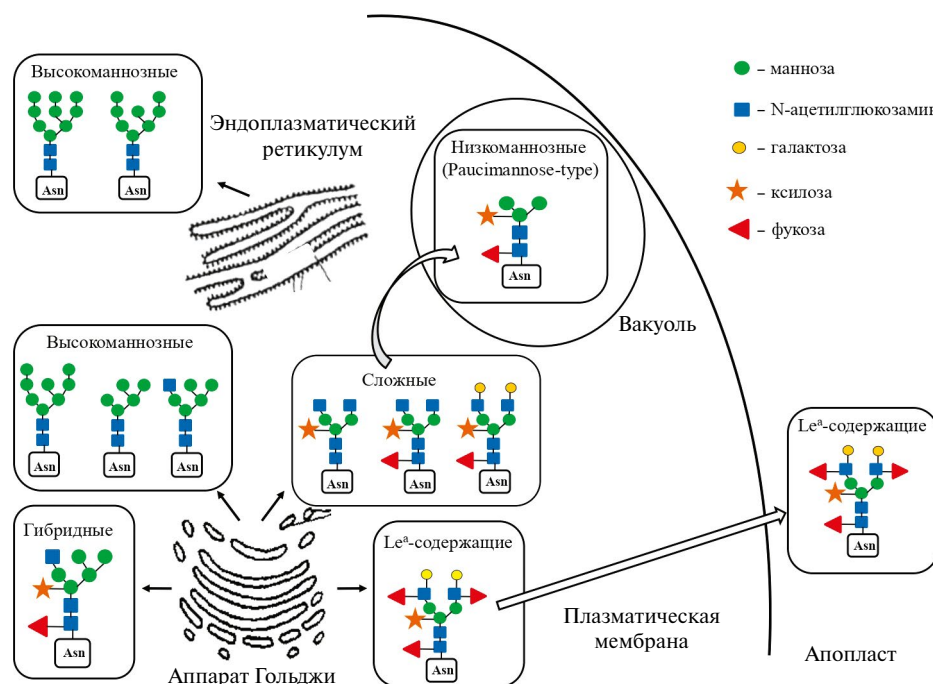


Рис. 3. Типы структур *N*-гликанов растительных гликопротеинов и их локализация в клетке.

Высокоманнозные *N*-гликаны – гликаны, содержащие исключительно остатки маннозы, присоединенные к коровому олигосахариду. Гликаны сложного типа несут β -1,2-связанные остатки ксилозы и α -1,3-связанные остатки фукозы, присоединенные к коровому олигосахариду $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Le^a-содержащие гликаны – гликаны с терминальным трисахаридом ($\text{Fuc}\alpha 1,4(\text{Gal}\beta 1,3)\text{GlcNAc}$). Низкоманнозные гликаны (рауциманнозные) – гликаны, не содержащие концевых остатков *N*-глюкозамина (GlcNAc) на своих невосстанавливающих концах. Гликаны гибридного типа – гликаны, у которых на концевых антеннах присутствуют как остатки GlcNAc , так и остатки маннозы.

канов, декорирующих белки растений [29, 33]. Тем не менее, некоторые вопросы остаются открытыми. Например, возможно, что перечень известных к настоящему времени ферментов процессинга гликанов не является исчерпывающим, поскольку идентификация ферментов *N*-гликозилирования в растениях может представлять определенную трудность, так как большинство гликозилтрансфераз в аппарате Гольджи участвует в биосинтезе различных полисахаридов клеточной стенки. При этом нельзя исключить, что некоторые из этих ферментов могут генерировать редкие модификации *N*-гликанов. Кроме того, ощущается недостаток как числа, так и разнообразия существующих мутантов процессинга *N*-гликанов. Полученные к настоящему времени мутанты, с одной стороны, не охватывают все этапы формирования гликанов, а с другой стороны, мутации могут оказывать плейотропный эффект на многочисленные гликопротеины, участвующие в том или ином процессе. Наконец, один из важнейших вопросов – как осуществляется регуляция этапов процессинга *N*-гликанов. Было показано, что биосинтез *N*-гликанов сложного типа в растениях регулируется через гомеостаз марганца и кальция с участием недавно идентифицированного

трансмембранного белка 165 (TMEM165) [9], однако очевидно, что регуляция такого сложного процесса, как *N*-гликозилирование должна быть многофакторной с привлечением большого количества участников. Таким образом, исследование процесса *N*-гликозилирования белков у растений все еще нуждается в дополнениях и детализации.

РОЛЬ *N*-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ РОСТА, РАЗВИТИЯ И В ОТВЕТАХ РАСТЕНИЙ НА СТРЕССОВЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

N-связанные гликаны влияют на конформацию, стабильность и биологическую активность гликопротеинов растений, а также на их субклеточную локализацию и секрецию [11, 21]. Это, в свою очередь, оказывает влияние на такие жизненно важные процессы, как рост, развитие и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [5, 15, 20]. Так, широкомасштабный анализ *N*-гликозилированных белков в листьях проростков пшеницы позволил идентифицировать 248 *N*-связанных гликопротеинов, которые, по мнению авторов, могут играть важную роль в росте растений. Эти гликопротеины

в основном были вовлечены в реконструкцию клеточных стенок, клеточную сигнализацию, реакции на стресс [34]. Значительные различия в количестве гликопротеинов и степени их гликозилирования были выявлены на разной стадии спелости плодов томата (*Solanum lycopersicum* L.), у которых по мере созревания повышался уровень гликозилирования ферментов, участвующих в размягчении плодов (α -маннозидаза, β -D-N-ацетилгексозаминидаза) [35].

Наглядным доказательством значимости процесса N-гликозилирования для роста и развития служат растения с нарушением отдельных этапов формирования гликанов. Снижение фотосинтетической способности и уменьшение сухой массы выявлялись у мутантов *A. thaliana* *alg3-3* (*asparagines linked glycosylation 3*), дефектных по биосинтезу долихолфосфат-связанных гликанов и *cgl1-1* (*complex glycan less*), в которых полностью отсутствовали сложные N-гликаны [13]. Кроме того, корни *cgl1* имели более длинные корневые волоски [14] и сильнее реагировали на фитогормоны, показывая, что сложные гликаны могут быть связаны с гомеостазом гормонов в растениях. У проростков томатов (*S. lycopersicum* L.) с сильно сниженной активностью N-ацетилглюкозаминтрансферазы I наблюдался некроз плодоножек и раннее опадение плодов, а растения с редуцированной α -маннозидазой II аппарата Гольджи имели скрученные листья и пониженную способность к образованию семян [15]. Потеря функции N-ацетилглюкозаминтрансферазы II у *A. thaliana* предотвращала образование гликанов с двумя концевыми остатками GlcNAc, и мутанты *gntII* показывали многочисленные фенотипы развития, включая раннее цветение и ускоренное старение листьев в темноте [36].

Наличие или отсутствие N-гликанов у гликопротеинов оказывало значительное влияние и на устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям [4, 37, 38]. Так, анализ N-гликопротеома плазматической мембраны листьев проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), подвергнутых действию засухи, выявил изменение уровня гликозилирования большинства идентифицированных гликопротеинов, которые обладали протеинкиназной активностью или были вовлечены в рецепцию и трансдукцию внеклеточных сигналов, а также в ремоделирование клеточной стенки растений [2]. В кончиках корней сои (*Glycine max* (L.) Merr.), подвергнутых затоплению, наблюдалось накопление одних N-гликопротеинов (связанных с деградацией белков, клеточной стенкой и гликолизом) и снижение других (гликозилгидролазы, пероксидазы, белки, связанные с защитной реакцией на стресс) [39]. Изменение количества N-гликопротеинов у проростков томатов (*S. lycopersicum* L.)

влияло на их способность адаптироваться к солевому стрессу [40]. Мутанты *lew3* (*leaf wilting 3*) *A. thaliana* с нарушением одного из ранних этапов процессинга N-гликанов, а именно переноса маннозы на долихол-связанный олигосахарид на цитозольной стороне мембраны эндоплазматического ретикулума, были более чувствительны к осмотическому стрессу [41].

Важность процесса N-гликозилирования была показана для выживания растений в условиях различных биотических стрессов [37, 38, 42]. Профиль N-гликанов проростков *A. thaliana*, инфицированных бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, значительно отличался от такового у контрольных растений, показывая повышенное содержание низкоманнозных гликоформ и накопление неправильно свернутых гликопротеинов [42]. Мутантные линии *A. thaliana*, дефектные по ферменту синтеза предшественника N-гликанов *alg3* или по субединице олигосахарилтрансферазного комплекса *stt3a* (*staurosporin and temperature sensitive 3a*), были более восприимчивы к заражению *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 по сравнению с растениями дикого типа, а последний мутант проявлял чувствительность еще и к *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora* [37, 43]. На примере *stt3a* было показано, что эффект N-гликозилирования на устойчивость к биотическим стрессорам может проявляться на уровне рецепции сигналов. У этих мутантов нарушалась функциональная активность рецепторных протеинкиназ EFR и FLS2, восприимчивых к бактериальным факторам элонгации трансляции Tu (*elf18*) и флагеллину (*flg22*), соответственно [44]. По мнению авторов, именно N-гликаны, прикрепленные к эктодоменам рецепторов опознавания паттернов (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) плазматической мембраны, играют критическую роль в распознавании лигандов при взаимодействии растений и патогенов. Защитные реакции, направленные против вирусных и микробных патогенов, могут быть опосредованы белками-шаперонами, участвующими в процессе фолдинга гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме [45]. Так, было показано, что специфичный для растений кальретикулин NbCRT3a, участвующий в созревании гликозилированных рецепторов клеточной поверхности, вовлечен в формирование устойчивости *N. benthamiana* к заражению *Phytophthora infestans* [46].

Изменение процесса N-гликозилирования белков не только путем нарушения прохождения его этапов, но и с помощью модификации отдельных остатков сахаров в гликане, может также влиять на рост и устойчивость растений. Проростки *O. sativa*, лишённые остатков коровой α -1,3-фукозы, демонстрировали полукарликовый фенотип и сниженный гравитропический

ответ [19], а отсутствие остатков ксилозы на коровом олигосахариде приводило к повышению чувствительности растений к низкотемпературному стрессу [47]. У *A. thaliana* отсутствие остатков фукозы на коровом N-гликане усиливало чувствительность мутантов к засолению, при этом отсутствие ксилозы не сопровождалось таким эффектом [15]. Для удлинения корневых волосков у *A. thaliana* были важны не столько модификации корового гликана, связанные с присоединением ксилозы или фукозы, сколько терминальные модификации сложных гликанов, такие как наличие остатков маннозы или отсутствие остатков GlcNAc на обеих антеннах или блокировка терминальных удлинений [14]. Удаление терминальных остатков маннозы на N-гликанах являлось необходимым как для процесса образования корней [48], так и для формирования устойчивости проростков *A. thaliana* к солевому и осмотическому стрессам [49].

При обширном количестве статей о роли N-гликозилирования в процессах, протекающих в растениях [34–38; 47–49], все еще остается некоторая разрозненность публикуемых данных. До сих пор нет целостного представления, как отдельные сахара или наборы гликоформ влияют на свойства белков, к которым они присоединены. Какие гликопротеины играют ключевую роль в том или ином процессе? Как меняется структура гликанов в ходе развития этих процессов? Для построения более полной картины участия N-гликозилирования белков в процессах роста, развития и в ответах растений на стрессовые воздействия, требуется расширение, как перечня исследуемых воздействий, так и набора объектов исследования. Помимо этого, исследования структуры и функции гликанов должны развиваться параллельно. Так, наблюдаемые во время развития или в стрессовых условиях отличия в N-гликозилировании белков желательно сопровождать анализом структурных модификаций N-гликанов на отдельных гликопротеинах, и, наоборот, выявленные структурные изменения необходимо подкреплять экспериментами, демонстрирующими роль этих структур в функционировании того или иного процесса.

ОСНОВНЫЕ МОМЕНТЫ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРОЦЕССА N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В РАСТЕНИЯХ

Количество сайтов и разнообразие гликоформ на гликобелках. Количество сайтов гликозилирования у растений может ограничиваться одним-двумя, как у гликопротеина семян фасоли — фазеолина [50] и миракулина — гликопротеина *Synsepalum dulcicum* [51], доходить до восьми, как

у мембранно-связанной эндо- β -1,4-глюканазы [52] или даже до 15, как у лакказы — фермента, относящегося к классу оксидаз [24]. При этом количество сайтов гликозилирования не определяется ни наличием остатков аспарагина в гликопротеине, ни даже консенсусной последовательностью узнавания (Asn-X-Ser/Thr), так как только для 2/3 этих секвенсов доказан факт гликозилирования [53]. Это указывает на то, что необходимо учитывать влияние и других факторов при прогнозировании количества сайтов. Так, было показано, что наличие или отсутствие определенных аминокислотных остатков в консенсусной последовательности или рядом с ней [53], а также трехмерная структура белка [54] играют немаловажную роль в определении количества сайтов и типа их гликозилирования. Сайты гликозилирования обычно находятся на гидрофобных участках поверхности белка [55], а расположение аспарагина на β -витке белковой молекулы обеспечивает доступность для олигосахарилтрансферазы [56]. При этом топология белков может быть такова, что большинство их потенциальных сайтов N-гликозилирования не обращены в просвет эндоплазматического ретикула или аппарата Гольджи и поэтому недоступны для олигосахарилтрансферазы [57].

Несмотря на существование ограниченного числа типов гликоформ, используемых для модификации гликопротеинов растений (рис. 3) [21], их количества достаточно для получения значительной макрорегетерогенности (формируемой занятостью сайтов гликозилирования на молекуле белка) и микрогетерогенности (характеризующей разнообразие содержания разных гликоформ в отдельном сайте) N-гликанов, наблюдаемых в растительных организмах [33]. Макрорегетерогенность определяется спецификой организма, типом клеток, а также структурными характеристиками белковой молекулы [58]. Микрогетерогенность возникает из-за вариаций процессинга N-гликанов, который зависит от многочисленных клеточных факторов, включая специфичную для тканей/клеток экспрессию ферментов, их концентрации и кинетические параметры, доступность доноров нуклеотидных сахаров, а также время пребывания гликопротеинов в различных клеточных компартментах. Структурный анализ зрелых гликопротеинов показал, что некоторые гликопротеины модифицированы исключительно гликанами высокоманнозного типа, в то время как другие имеют как высокоманнозный тип гликанов, так и N-гликаны сложного или низкоманнозного типа на разных сайтах N-гликозилирования [59]. Это показывает, что на одном и том же гликопротеине некоторые N-гликаны подвергаются модификации в аппарате Гольджи и после его прохождения, в то время как другие — нет, что определяется их доступностью процессинго-

вым ферментам. Например, гликопротеин семян фасоли фазеолин гликозилирован гликаном низкоманнозного типа и гликаном с высоким содержанием маннозы, что связано с плохой доступностью последнего для ферментов и отсутствием возможности его дальнейшей модификации [50].

Все это приводит к разнообразию количества гликанов, степени их модификации и разнородности олигосахаридных структур на одном и том же гликопротеине [59], что необходимо учитывать, в частности, при производстве рекомбинантных белков [60, 61]. Поэтому в зависимости от поставленных целей при исследовании процесса гликозилирования необходимо использовать разные подходы. Например, анализ интактных гликопептинов и дегликозилированных пептидов позволяет оценить макрорегерогенность гликозилирования, но только анализ интактных гликопептинов позволит охарактеризовать микрогетерогенность [62]. При этом и в том и другом случае структурный анализ гликанов останется за рамками исследования и будет возможен только при высвобождении их из гликопротеинов [63].

Особенности *N*-гликозилирования, связанные с локализацией гликопротеинов. Анализ распределения *N*-гликопротеинов в интегральных белках вакуолярной и плазматической мембран *A. thaliana* показал, что потенциальные сайты *N*-гликозилирования гораздо реже встречаются в белках тонопластов и, в отличие от плазматической мембраны растений, тонопласт почти или полностью лишен *N*-гликопротеинов с модифицированными в аппарате Гольджи гликанами [64]. Большинство вакуолярных гликопротеинов и запасных гликопротеинов семян, описанных на данный момент, гликозилированы *N*-гликанами низкоманнозного типа (paucimannosidic type), содержащими остатки фукозы и/или ксилозы, но лишенных концевых остатков глюкозамина [11]. При этом у вакуолярных белков до сих пор не обнаружены Le^a -содержащие гликаны, которые широко представлены у секретируемых и связанных с плазмалеммой гликопротеинов [59]. Поскольку Le^a -содержащие *N*-гликаны обнаруживаются только на внеклеточных гликопротеинах растений, их наличие может служить как маркером транспорта гликопротеинов через секреторную систему растений, так и маркером локализации гликопротеинов в растительной клетке [33].

Таким образом, по модификации *N*-гликанов, декорирующих гликопротеин, можно определить его потенциальную локализацию в клетке растений.

Особенности *N*-гликозилирования, связанные с возрастом растений. Установлено, что профиль гликозилирования эндогенных белков зависит от стадии развития растения или органа [65, 66].

Так, в стареющих листьях проростков табака наблюдалось увеличение количества *N*-гликанов без терминального *N*-ацетилглюкозамина и уменьшение высокоманнозных гликанов [65]. Кроме того, стадия развития и положение листьев (верхний, средний или нижний ярус) влияли на профиль *N*-гликозилирования рекомбинантных белков, экспрессируемых в растениях *Nicotiana plumbaginifolia* [66]. Во время созревания эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.) на гликопротеинах наблюдалось изменение типа гликоформ от преимущественно низкоманнозных (paucimannosidic type) к преимущественно гликановым структурам, лишенным фукозы [67]. Содержание Le^a -содержащих *N*-гликанов варьировало во время развития семян как у *A. thaliana*, так и у *Brassica napus* [29].

Особенности *N*-гликозилирования в зависимости от вида и органа растений. Несмотря на то, что в целом механизм *N*-гликозилирования в растениях в высокой степени консервативен с сохранением общей схемы биосинтеза и созревания *N*-гликанов, существуют различия по структуре и соотношению паттернов гликозилирования в зависимости от класса, вида или органа растения [33, 59], что следует иметь в виду при выборе объекта исследования. Так, если у проростков *A. thaliana* преобладают гликаны сложного типа (около 45%) [33], то у *Lotus japonicas* – высокоманнозные (около 49%) [68], а у *N. benthamiana* около 45% составляют низкоманнозные (paucimannosidic type) структуры [69]. При этом наиболее часто используемое модельное растение *A. thaliana* с преобладанием сложных гликановых структур демонстрирует их слабое разнообразие [33], в частности, количество Le^a -содержащих *N*-гликанов сложного типа у проростков резуховидки Таля было незначительным по сравнению с другими видами [25]. Различия в гликозилировании белков были выявлены не только у представителей разных видов, но и у растений, относящихся к более близким таксономическим группам. Например, гликановые профили белка пататина из клубней картофеля отличались у разных подвидов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [70].

Анализ органоспецифического *N*-гликозилирования, проведенный для оценки распределения Le^a -содержащих гликанов на гликопротеинах *A. thaliana*, показал, что если цветоножки и стебли растений содержали большое количество этих структур, то в стручках, корнях и побегах их количество было невелико и они совсем отсутствовали в листьях и черешках [29]. Семена однодольных растений, таких как рис и кукуруза, были очень бедны структурами с концевыми антеннами Le^a [71] в отличие от семян двудольных, включая гречиху, горох, маш, в которых эти структуры были широко представлены [72].

Эти знания могут быть полезны для правильного выбора объекта, в частности, при производстве терапевтических белков [73], поскольку гликановый профиль фармацевтических препаратов растительного происхождения будет различаться в зависимости от вида, возраста или органа растения, что следует учитывать, например, для того, чтобы снизить количество специфических остатков, вызывающих пищевую аллергию [74].

Проблемы использования мутантов при исследовании процесса N-гликозилирования. Использование мутантных форм с нарушением отдельных звеньев процесса созревания гликанов — обычная практика в исследовании процесса N-гликозилирования и роли гликанов в растениях [21, 75]. Однако следует учитывать, что фенотипические проявления мутаций, нарушающих формирование гликопротеинов, будут зависеть от многих факторов. Это может создать проблемы при попытках установить причинно-следственные связи между первичными дефектами N-гликозилирования и наблюдаемыми изменениями развития, а также затруднить определение целевых белков.

Так, например, солевой стресс приводил к набуханию корней у мутантов *cgl1*, *stt3a* и *lew3* *A. thaliana* [10, 41]. Однако только у первых двух мутантов наблюдалось изменение N-гликозилирования и снижение активности KOR1 (KORRIGAN) [8]. Это позволило предположить, что влияние мутации *lew3* на солечувствительность и развитие растений резуховидки Таля должно быть обусловлено изменением гликозилирования и, соответственно, активности других гликопротеинов, участвующих в осморегуляции [41].

Анализ данных литературы показал, что мутации в генах, кодирующих одни и те же белки или ферменты, участвующие в процессинге гликанов, могут вызывать разные фенотипические проявления в зависимости от вида растения, что хорошо видно при сравнении мутантов *A. thaliana* и *O. sativa*. Так, дефект субъединицы олигосахарилтрансферазы приводил к разному воздействию на рост мутантов *osdgl1* риса [76] и мутантов *dgl1* резуховидки Таля [77]. В первом случае рост проростков лишь немного снижался, а во втором — наблюдалось появление карликового фенотипа. Если у мутантов риса с нарушением работы фермента α -глюкозидазы I эндоплазматического ретикулума (*osmog*) наблюдалось формирование коротких корней [78], то аналогичное нарушение у мутантов *A. thaliana* (*knf*) приводило к летальности эмбрионов [79]. Задержка развития имела место у мутантов риса (*gnt1*) с нарушенной работой фермента аппарата Гольджи — β -1,2-N-ацетилглюкозаминтрансферазы I (GnTI) [18], а мутация *A. thaliana* по

тому же ферменту (*cgl1*) вызывала ростовой дефект только в условиях засоления [10]. Подавление экспрессии гена GnTI, приводящее к снижению количества сложных N-гликанов [20], не приводило к каким-то дефектам роста или размножения у *N. benthamiana* [80], в то время как у растений томата наблюдалось аномальное созревание плодов [15], а у представителя бобовых *L. japonicas* — серьезные дефекты роста с летальностью проростков до достижения ими стадии цветения [68].

Представленные факты еще раз демонстрируют многочисленность и разнообразие ролей, которые N-гликаны могут играть в растениях и то, что эти роли должны рассматриваться в привязке к особенностям того или иного вида. Кроме того, подобный анализ мутантов позволит выявлять такие растения, которые будут хорошо переносить генетические манипуляции и сохранять жизнеспособность в отсутствии привычных для растений типов гликанов, как, например, *N. benthamiana*, которое широко используется для производства биофармацевтических препаратов [81].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗНАНИЙ О ПРИНЦИПАХ И МЕХАНИЗМАХ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЛИКОИНЖИНИРИНГА РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Накопление знаний о принципах и механизмах N-гликозилирования в растениях расширяют возможности их использования в практических целях, в частности, для создания подходящих гликоформ при получении рекомбинантных белков, представляющих терапевтическую ценность [82–84], поскольку в большинстве случаев такие белки являются N-гликозилированными [61], и прикрепленные гликаны оказывают сильное влияние на стабильность, активность и фармакодинамику этих гликопротеинов в организме человека [85].

Однако наличие у растений специфических гликанов, которые отсутствуют у млекопитающих и, следовательно, являются потенциально иммуногенными [74], а также меньшее структурное разнообразие гликанов [5, 82] создают ряд трудностей и порой ограничивают широкое использование растений для фармацевтического производства в качестве альтернативы клеточным линиям млекопитающих. Таким образом, основными задачами гликоинженерии при модификации растительных гликанов являются устранение специфических для растений и введение специфических для клеток млекопитающих реакций, приводящих к так называемой “гуманизации” растений [86]. Наиболее известное и исследованное отличие гли-

кановых структур растений состоит в наличии сложных гликанов, содержащих β -1,2-ксилозу и α -1,3-фукозу [21]. Нокаут соответствующих генов *FucT* и *XylT* у *A. thaliana* приводил к накоплению растениями большого количества структур *N*-гликанов, не содержащих остатков β -1,2-ксилозы и α -1,3-фукозы [22]. Сравнительно недавно с помощью методики CRISPR/Cas9 для направленного редактирования генома были получены линии *N. benthamiana* для производства рекомбинантных белков, полностью лишенных остатков коровой α -1,3-фукозы и/или β -1,2-ксилозы [15]. Другие специфические типы модификаций растительных гликанов – это декорирование корового *N*-гликана β -1,3-галактозой и α -1,4-фукозой (*Le^a*-содержащие гликаны) или удаление концевых остатков GlcNAc от корового гликана, приводящее к формированию низкоманнозных *N*-гликанов (раусиманнозного типа). Хотя последние не так распространены, а эпитопы Льюиса А встречаются и у животных, эти структуры нередко рассматриваются как нежелательные, отрицательно влияющие на эффективность рекомбинантных белков при их терапевтическом применении [69]. Нокаут генов β -1,3-галактозилтрансферазы и α -1,4-фукозилтрансферазы у мха *Physcomitrella patens* приводил к продукции эритропоэтина, лишенного эпитопа Льюиса А [87], а нокаут гена β -гексозаминидазы приводил к снижению низкоманнозных форм (раусиманнозидного типа), значительно увеличивая количество сложных *N*-гликанов на α 1-антитрипсине млекопитающих, продуцируемом *N. benthamiana* [69].

Отсутствие у растений специфичного для млекопитающих набора ферментов гликозилирования приводит к отсутствию у них таких модификаций, как формирование дополнительных антенн, галактозилирование, кэпирование остатками сиаловой кислоты, которые являются специфичными для млекопитающих [86]. Использование контролируемой экспрессии гетерологичных ферментов в *N. tabacum* позволило получить двурассеченные, разветвленные [88] и многоантенные структуры [89], а также гликаны с β -1,4-галактозой [90] и остатками сиаловой кислоты [91]. Последнее особенно важно, поскольку сиалирование – это важная модификация гликопротеинов человека, которая не была реализована в достаточной степени в клетках китайского хомячка, традиционно используемых в качестве платформы для получения рекомбинантных белков [92]. Более того, в *N. benthamiana* за счет комбинированной экспрессии набора ферментов было достигнуто полисиалирование, которое имитировало процесс, имеющий место в клетках млекопитающих [91].

Другой важной задачей инженерии растительных *N*-гликанов является уменьшение их ге-

терогенности для получения стабильной эффективности рекомбинантных гликопротеинов [93]. И если в области “гуманизации” растительных гликанов были достигнуты значительные успехи, то получение препаратов с минимальной гетерогенностью гликанов все еще остается узким местом. Сложность заключается в том, что различия в эффективности *N*-гликозилирования во многом обусловлены свойствами OST-комплекса растений, состоящего из нескольких субъединиц, структурные и функциональные характеристики которых до конца не изучены [94]. Считается, что растительный OST-комплекс имеет уникальные предпочтения в аминокислотных последовательностях, и не все потенциальные сайты *N*-гликозилирования распознаются *in vivo*, что приводит к недостаточному гликозилированию рекомбинантных белков в растениях [18]. Попытки решить эту проблему путем сверхэкспрессии односубъединичного OST-комплекса *Leishmania major* в клетках *N. benthamiana* не привели к ожидаемым результатам [95]. У рекомбинантных гликопротеинов наблюдалось только небольшое увеличение занятости отдельных сайтов, но заполняемость сайтов в целом не улучшалась, а экспрессия чужеродного OST-комплекса оказывала негативное влияние, приводя к снижению общего выхода продуцируемых белков [95]. Вместе с тем, некоторые исследования опровергают существующее мнение, что недостаточное гликозилирование приводит к потере выхода целевых белков, поскольку значительное агликозилирование не только не влияло на выход и сборку антител mAb 2G12, накапливаемых в рисе, но даже увеличивало их ВИЧ-нейтрализующую активность [96]. Таким образом, должны быть предприняты дополнительные усилия для исследования структуры и функциональности OST-комплекса растений, чтобы понять, чем вызваны наблюдаемые противоречия и как можно преодолеть существующие ограничения в гликозилировании растительных белков. Кроме того, стремление получить однородный материал с использованием подходов, направленных на снижение гетерогенности гликанов, будет приводить к потере отдельных гликоформ, имеющих уникальные физические или биологические свойства, которые могут быть полезны в определенных случаях. Например, низкоманнозные *N*-гликаны (раусиманнозидного типа) в целом рассматриваются как нежелательные при производстве рекомбинантных терапевтических белков, и в основном используются приемы, позволяющие снизить их количество [69]. Однако было показано, что некоторые из них необходимы для обеспечения доставки биофармацевтических препаратов к клеткам-мишеням при лечении заболеваний, относящихся к классу лизосомных болезней на-

копления (Lysosomal Storage Diseases), таких как мукополисахаридозы, муколипидозы, гликогенозы [97]. Так, структура $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ обладала повышенной способностью к связыванию с маннозным рецептором на поверхности клеток по сравнению со структурами, имеющими более высокое содержание остатков маннозы [97], и были разработаны специальные методические подходы, нацеленные на повышение содержания этих структур в клетках растений [98].

Узким местом производства терапевтических белков в растительных экспрессионных системах считается этап фолдинга целевых белков и низкие уровни, наблюдаемые при накоплении вирусных или бактериальных гликопротеинов в растениях, что, по мнению исследователей, может быть отражением различий в механизме функционирования их шаперонов [99]. Внедрение шаперонов, полученных из того же источника, что и целевые белки, способствовало улучшению сворачивания и увеличению накопления рекомбинантных белков, как было показано при коэкспрессии шаперонов млекопитающих в *N. benthamiana* [99]. Однако узкий набор исследованных к настоящему времени гликопротеинов и шаперонов ограничивает использование этого гликоинженерного подхода для производства рекомбинантных вакцин.

В последнее время успешной стратегией является объединение сразу нескольких подходов. Например, для качественного и количественного улучшения производства антигена внешней оболочки ВИЧ-1 использовали растения *N. benthamiana*, лишенные α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы, для предотвращения образования специфичных для растений сложных N-гликанов. Одновременно применяли РНК-интерференцию для подавления образования маломаннозных гликанов и коэкспрессию кальретикулина с олигосахарилтрансферазой *Leishmania major* с целью улучшения занятости сайтов [84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя в изучении процесса N-гликозилирования растений и анализе биологической роли гликанов в последнее время были достигнуты значительные успехи [15, 20, 36, 51], все еще существуют узкие места, ограничивающие дальнейшее продвижение этих исследований. Во многом это связано как с очисткой отдельных гликанов и гликопротеинов, так и с их структурной и функциональной характеристикой. Если в решении первого вопроса наблюдается неуклонное продвижение вперед [100–102], то более сложная функциональная характеристика гликопротеинов растений и декорирующих их гликанов, требующая больше усилий и време-

ни, значительно отстает, хотя очевидно, что эти исследования должны развиваться параллельно. Изучение совокупности всех гликанов и гликопротеинов, выявляемых в клетке, ткани или в целом растительном организме в определенное время, в определенном месте и при определенных условиях, является пока еще недостижимым идеалом. Но именно такой всеобъемлющий подход позволит лучше понять разнообразные роли различных гликанов, модифицирующих белки, выявляя их вклад в функционирование растительного организма, давая полезную информацию, которую можно было бы использовать в практических целях. Исследованию процесса N-гликозилирования способствует полное секвенирование генома у все большего числа видов растений и доступность технологий его редактирования, что открывает пути для эффективных модификаций реакций процессинга N-гликанов. Получение мутантов с использованием методик сайт-направленного мутагенеза по сайтам гликозилирования отдельных гликопротеинов также является эффективным направлением для исследования роли того или иного гликана.

Вместе с тем биохимические исследования гликозилированных белков резко ограничиваются методическими сложностями. Для полного понимания механизмов реализации функции гликозилированного белка необходима характеристика того, какой именно гликан и в каком именно из потенциально возможных сайтов присоединен к белку. Пока подобные сведения крайне сложно получить даже для индивидуального белка, не говоря о сложных их совокупностях. Одна из существенных проблем в области гликопротеомики растений — это разработка надежных биоинформатических инструментов для анализа гликанов. Из-за сложности и разнообразия возникающих фрагментов, которые меняются в зависимости от условий проводимой масс-спектрометрии при фрагментации гликопротеинов и гликанов, а также высокого уровня гетерогенности гликанов, имеются ограничения для крупномасштабной идентификации гликопротеинов посредством поиска в базах данных. Поэтому длительная обработка данных вручную является узким местом для характеристики гликопротеинов.

Тем не менее, несмотря на то, что в гликобиологии растений остается много нерешенных вопросов, расширение методической базы в области протеомики, появление новых стратегий обогащения, разделения и анализа гликанов, разработка в области редактирования генов, развитие методов моделирования сложных гликанов и гликозилированных белков вносят оптимистическую ноту в перспективу развития этого направления. Увеличение количества

идентифицированных гликопротеинов и сайтов гликозилирования, которые связаны с ростом и развитием растений и с их реакцией на окружающую среду, поможет в расшифровке механизмов гликозилирования растительных белков и будет способствовать пониманию их функциональной роли в этих процессах.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 20-64-47036, а также Государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress // *Proteomes*. 2016. V. 4. P. 42. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040042>
2. Chang Y., Zhu D., Duan W., Deng X., Zhang J., Ye X., Yan Y. Plasma membrane *N*-glycoproteome analysis of wheat seedling leaves under drought stress // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 193. P. 1541. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.217>
3. Muleya V., Lois L.M., Chahtane H., Thomas L., Chiapello M., Marondedze C. (De)activation (ir) reversibly or degradation: dynamics of post-translational protein modifications in plants // *Life*. 2022. V. 12. P. 324. <https://doi.org/10.3390/life12020324>
4. Nguema-Ona E., Vicre-Gibouin M., Gotte M., Plancot B., Lerouge P., Bardor M., Driouich A. Cell wall *O*-glycoproteins and *N*-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 499. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00499>
5. Nagashima Y., von Schaewen A., Koiwa H. Function of *N*-glycosylation in plants // *Plant Sci.* 2018. V. 274. P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.007>
6. Mellquist J., Kasturi L., Spitalnik S., Shakin-Eshleman S. The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of *N*-linked core glycosylation efficiency // *Biochem.* 1998. V. 37. P. 6833. <https://doi.org/10.1021/bi972217k>
7. Shakin-Eshleman S., Spitalnik S., Kasturi L. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of *N*-linked core-glycosylation efficiency // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 6363. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6363>
8. Hebert D., Lamriben L., Powers E., Kelly J. The intrinsic and extrinsic effects of *N*-linked glycans on glycoproteostasis // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10. P. 902. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1651>
9. Toustou C., Walet-Balieu M.-L., Kiefer-Meyer M.-C., Houdou M., Lerouge P., Foulquier F., Bardor M. Towards understanding the extensive diversity of protein *N*-glycan structures in eukaryotes // *Biol. Rev.* 2022. V. 97. P. 732. <https://doi.org/10.1111/brv.12820>
10. Kang J.S., Frank J., Kang C.H., Kajiura H., Vikram M., Ueda A., Kim S., Bahk J.D., Triplett B., Fujiyama K., Lee S.Y., von Schaewen A., Koiwa H. Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 5933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800237105>
11. Lannoo N., Van Damme E.J.M. Review/*N*-glycans: the making of a varied toolbox // *Plant Sci.* 2015. V. 239. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.023>
12. Morales-Quintana L., Méndez-Yáñez A. α -Mannosidase and β -D-*N*-acetylhexosaminidase outside the wall: partner exoglycosidases involved in fruit ripening process // *Plant Mol. Biol.* 2023. V. 112. P. 107. <https://doi.org/10.1007/s11103-023-01356-2>
13. Jiao Q.-S., Niu G.-T., Wang F.-F., Dong J.-Y., Chen T.-S., Zhou C.-F., Hong Z. *N*-glycosylation regulates photosynthetic efficiency of *Arabidopsis thaliana* // *Photosynthetica*. 2020. V. 58. P. 72. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.153>
14. Frank M., Kaulfürst-Soboll H., Fischer K., von Schaewen A. Complex-type *N*-glycans influence the root hair landscape of *Arabidopsis* seedlings by altering the auxin output // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635714. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635714>
15. Kaulfürst-Soboll H., Mertens-Beer M., Brehler R., Albert M., von Schaewen A. Complex *N*-glycans are important for normal fruit ripening and seed development in tomato // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635962. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635962>
16. Jansing J., Sack M., Augustine S.M., Fischer R., Bortesi L. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking b-1,2-xylose and core a-1,3-fucose // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 350. <https://doi.org/10.1111/pbi.12981>
17. Herman X., Far J., Courtoy A., Bouhon L., Quinton L., De Pauw E., Chaumont F., Navarre C. Inactivation of *N*-acetylglucosaminyltransferase I and α 1,3-fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells results in glycoproteins with highly homogeneous, high-mannose *N*-glycans // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 634023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634023>
18. Fanata W.I., Lee K.H., Son B.H., Yoo J.Y., Harmoko R., Ko K.S., Ramasamy N.K., Kim K.H.,

- Oh D.-B., Jung H.S., Kim J.-Y., Lee S.Y., Lee K.O.* N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa* // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 966.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12087>
19. *Harmoko R., Yoo J.Y., Ko K.S., Ramasamy N.K., Hwang B.Y., Lee E.J., Kim H.S., Lee K.J., Oh D.-B., Kim D.-J., Lee S., Li Y., Lee S.Y., Lee K.O.* N-glycan containing a core α 1,3-fucose residue is required for basipetal auxin transport and gravitropic response in rice (*Oryza sativa*) // *New Phytol.* 2016. V. 212. P. 108.
<https://doi.org/10.1111/nph.14031>
 20. *Strasser R.* Recent developments in deciphering the biological role of plant complex N-glycans // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 897549.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.897549>
 21. *Strasser R.* Plant protein glycosylation // *Glycobiology.* 2016. V. 26. P. 926.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>
 22. *Strasser R., Altmann F., Mach L., Glössl J., Steinkellner H.* Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking b-1,2-linked xylose and core a-1,3-linked fucose // *FEBS Lett.* 2004. V. 561. P. 132.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00150-4)
 23. *Johnson K.D., Chrispeels M.J.* Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledon // *Plant Physiol.* 1987. V. 84. P. 1301.
<https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1301>
 24. *Beihammer G., Maresch D., Altmann F., Van Damme E.J.M., Strasser R.* Lewis A glycans are present on proteins involved in cell wall biosynthesis and appear evolutionarily conserved among natural *Arabidopsis thaliana* accessions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 630891.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630891>
 25. *Fitchette-Lainé A.C., Gomord V., Cabanes M., Michalski J.-C., Saint Macary M., Foucher B., Cavelier B., Hawes C., Lerouge P., Faye L.* N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells // *Plant J.* 1997. V. 12. P. 1411.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061411.x>
 26. *Ruiz-May E., Kim S.-J., Brandizzi F., Rose J.K.C.* The secreted plant N-glycoproteome and associated secretory pathways // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 117.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00117>
 27. *Liebinger E., Veit C., Pabst M., Batoux M., Zipfel C., Altmann F., Mach L., Strasser R.* Beta-N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10793.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178020>
 28. *Melo N.S., Nimtz M., Conradt H.S., Fevereiro P.S., Costa J.* Identification of the human Lewis (a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.) // *FEBS Lett.* 1997. V. 415. P. 186.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01121-6)
 29. *Gomord V., Fitchette A.-C., Menu-Bouaouiche L., Saint-Jore-Dupas C., Plasson C., Michaud D., Faye L.* Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 564.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x>
 30. *Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fitchette-Laine A.-C., Gomord V., Faye L.* N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 38. P. 31.
<https://doi.org/10.1023/A:1006012005654>
 31. *Fitchette A.C., Cabanes-Macheteau M., Marvin B., Satiat-Jeunemaitre B., Gomord V., Lerouge P., Faye L., Hawes C.* Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cells // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 333.
<https://doi.org/10.1104/pp.121.2.333>
 32. *Gutternigg M., Kretschmer-Lubich D., Paschinger K., Rendić D., Hader J., Geier P., Ranfil R., Jantsch V., Lochnit G., Wilson I.B.H.* Biosynthesis of truncated N-linked oligosaccharides results from non-orthologous hexosaminidase-mediated mechanisms in nematodes, plants and insects // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 27825.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704235200>
 33. *Zeng W., Ford K.L., Bacic A., Heazlewood J.L.* N-linked glycan micro-heterogeneity in glycoproteins of *Arabidopsis* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2018. V. 17. P. 413.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000165>
 34. *Wang X., Deng X., Zhu D., Duan W., Zhang J., Yan Y.* N-linked glycoproteome analysis reveals central glycosylated proteins involved in wheat early seedling growth // *Plant Physiol. Biochem.* 2021. V. 163. P. 327.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.009>
 35. *Zhang X., Tang H., Du H., Liu Z., Bao Z., Shi Q.* Comparative N-glycoproteome analysis provides novel insights into the regulation mechanism in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) during fruit ripening process // *Plant Sci.* 2020. V. 293. P. 110413.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110413>
 36. *Yoo J.Y., Ko K.S., Vu B.N., Lee Y.E., Yoon S.H., Pham T.T., Kim J.-Y., Lim J.-M., Kang Y.J., Hong J.C., Lee K.O.* N-acetylglucosaminyltransferase II is involved in plant growth and development under stress conditions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 761064.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.761064>
 37. *Kang B.S., Baek J.H., Macoy D.M., Chakraborty R., Cha J.-Y., Hwang D.-J., Lee Y.H., Lee S.Y., Kim W.Y., Kim M.G.* N-glycosylation process in both ER and Golgi plays pivotal role in plant immunity // *J. Plant Biol.* 2015. V. 58. P. 374.
<https://doi.org/10.1007/s12374-015-0197-3>
 38. *Lin B., Qing X., Liao J., Zhuo K.* Role of protein glycosylation in host-pathogen interaction // *Cells.* 2020. V. 9. P. 1022.
<https://doi.org/10.3390/cells9041022>

39. *Mustafa G., Komatsu S.* Quantitative proteomics reveals the effect of protein glycosylation in soybean root under flooding stress // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 627.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00627>
40. *Zhang X., Tang H., Du H., Bao Z., Shi Q.* Sugar metabolic and *N*-glycosylated profiles unveil the regulatory mechanism of tomato quality under salt stress // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 177. P. 104145.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104145>
41. *Zhang L., Xu Y., Yao H., Xie L., Yang P.* Boronic acid functionalized core–satellite composite nanoparticles for advanced enrichment of glycopeptides and glycoproteins // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. P. 10158.
<https://doi.org/10.1002/chem.200901347>
42. *Beihammer G., Romero-Pérez A., Maresch D., Figl R., Mócsai R., Grünwald-Gruber C., Altmann F., Van Damme E.J.M., Strasser R.* *Pseudomonas syringae* DC3000 infection increases glucosylated *N*-glycans in *Arabidopsis thaliana* // *Glycoconjugate. J.* 2023. V. 40. P. 97.
<https://doi.org/10.1007/s10719-022-10084-6>
43. *Trempel F., Kajiura H., Ranf S., Grimmer J., Westphal L., Zipfel C., Scheel D., Fujiyama K., Lee J.* Altered glycosylation of exported proteins, including surface immune receptors, compromises calcium and downstream signaling responses to microbe-associated molecular patterns in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/s12870-016-0718-3>
44. *Haweker H., Rips S., Koiwa H., Salomon S., Saijo Y., Chinchilla D., Robatzek S., von Schaewen A.* Pattern recognition receptors require *N*-glycosylation to mediate plant immunity // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 4629.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063073>
45. *Joshi R., Paul M., Kumar A., Pandey D.* Role of calreticulin in biotic and abiotic stress signalling and tolerance mechanisms in plants // *Gene.* 2019. V. 714. P. 144004.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144004>
46. *Matsukawa M., Shibata Y., Ohtsu M., Mizutani A., Mori H., Wang P., Ojika M., Kawakita K., Takemoto D.* *Nicotiana benthamiana* calreticulin in 3a is required for the ethylene mediated production of phytoalexins and disease resistance against oomycete pathogen *Phytophthora infestans* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2013. V. 26. P. 880.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0301-R>
47. *Takano S., Matsuda S., Funabiki A., Furukawa J., Yamauchi T., Tokui Y., Nakazono M., Shinohara Y., Takamure I., Kato K.* The rice RCN11 gene encodes β 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones // *Plant Sci.* 2015. V. 236. P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.022>
48. *Veit C., König J., Altmann F., Strasser R.* Processing of the terminal α -1,2-linked mannose residues from oligomannosidic *N*-glycans is critical for proper root growth // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1807.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01807>
49. *Liu C., Niu G., Zhang H., Sun Y., Sun S., Yu F., Lu S., Yang Y., Li J., Hong Z.* Trimming of *N*-glycans by the Golgi-localized α -1,2-mannosidases, MNS1 and MNS2, is crucial for maintaining RSW2 protein abundance during salt stress in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 678.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.006>
50. *Sturm A., Van Kuik J.A., Vliegenter J.F., Christeels M.J.* Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 13392.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)76439-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)76439-4)
51. *Kajiura H., Hiwasa-Tanase K., Ezura H., Fujiyama K.* Effect of fruit maturation on *N*-glycosylation of plant-derived native and recombinant miraculin // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 178. P. 70.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.026>
52. *Rips S., Bentley N., Jeong I.S., Welch J.L., von Schaewen A., Koiwa H.* Multiple *N*-glycans cooperate in the subcellular targeting and functioning of *Arabidopsis* KORRIGAN1 // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 3792.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.129718>
53. *Rubin E., Ben-Dor S., Sharon N.* Biases and complex patterns in the residues flanking protein *N*-glycosylation site // *Glycobiology.* 2004. V. 14. P. 95.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh004>
54. *Dwek R.A.* Glycobiology: towards understanding the function of sugars // *Chem. Rev.* 1996. V. 96. P. 683.
<https://doi.org/10.1021/cr940283b>
55. *Petrescu A.J., Milac A.L., Petrescu S.M., Dwek R.A., Wormald M.R.* Statistical analysis of the protein environment of *N*-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding // *Glycobiology.* 2004. V. 14. P. 103.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh008>
56. *Zielinska D.F., Gnad F., Schropp K., Wisniewski J.R., Mann M.* Mapping *N*-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery // *Mol. Cell.* 2012. V. 46. P. 542.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.031>
57. *Zielinska D.F., Gnad F., Wisniewski J.R., Mann M.* Precision mapping of an *in vivo* *N*-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints // *Cell.* 2010. V. 141. P. 897.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.012>
58. *Hofbauer A., Stoger E.* Subcellular accumulation and modification of pharmaceutical proteins in different plant tissues // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. P. 5495.
<https://doi.org/10.2174/1381612811319310005>
59. *Ko K., Ahn M.-H., Song M., Choo Y.-K., Kim H.S., Ko K., Joung H.* Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants // *Mol. Cells.* 2008. V. 25. P. 494.

60. *Montero-Morales L., Steinkellner H.* Advanced plant-based glycan engineering // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018. V. 6. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00081>
61. *Dammen-Brower K., Epler P., Zhu S., Bernstein Z.J., Stabach P.R., Braddock D.T., Spangler J.B., Yarema K.J.* Strategies for glycoengineering therapeutic proteins // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 863118.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863118>
62. *Fang Z., Qin H., Mao J., Wang Z., Zhang N., Wang Y., Liu L., Nie Y., Dong M., Ye M.* Glyco-Decipher enables glycan database-independent peptide matching and in-depth characterization of site-specific N-glycosylation // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 1900.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29530-y>
63. *Haslam S.M., Freedberg D.I., Mulloy B., Dell A., Stanley P., Prestegard J.H.* Structural analysis of glycans // *Essentials of Glycobiology* [Internet] 4th ed./ Eds. A. Varki et al. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2022. Chapter 50.
64. *Pedrazzini E., Caprera A., Fojadelli I., Stella A., Rocchetti A., Bassin B., Martinoia E., Vitale A.* The *Arabidopsis* tonoplast is almost devoid of glycoproteins with complex N-glycans, unlike the rat lysosomal membrane // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 1769.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv567>
65. *Elbers I.J., Stoop G.M., Bakker H., Stevens L.H., Bardor M., Molthoff J.W., Jordi W.J., Bosch D., Lommen A.* Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 1314.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1314>
66. *Lim C.-Y., Lee K.J., Oh D.-B., Ko K.* Effect of the developmental stage and tissue position on the expression and glycosylation of recombinant glycoprotein GA733-FcK in transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 2014.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00778>
67. *Arcalis E., Stadlmann J., Marcel S., Drakakaki G., Winter V., Rodriguez J., Fischer R., Altmann F., Stoger E.* The changing fate of a secretory glycoprotein in developing maize endosperm // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. P. 693.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.152363>
68. *Pedersen C.T., Loke I., Lorentzen A., Wolf S., Kamble M., Kristensen S.K., Munch D., Radutoiu S., Spillner E., Roepstorff P., Thaysen-Andersen M., Stougaard J., Dam S.* N-glycan maturation mutants in *Lotus japonicus* for basic and applied glycoprotein research // *Plant J.* 2017. V. 91. P. 394.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13570>
69. *Shin Y.J., Castilho A., Dicker M., Sadio F., Vavra U., Grunwald-Gruber C., Kwon T.H., Altmann F., Steinkellner H., Strasser R.* Reduced paucimannosidic N-glycan formation by suppression of a specific beta-hexosaminidase from *Nicotiana benthamiana* // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 197.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12602>
70. *Lattova E., Brabcova A., Bartova V., Potesil D., Bartta J., Zdrahal Z.* N-glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. P. 3243.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00426>
71. *Leonard R., Kolarisch D., Paschinger K., Altmann F., Wilson I.B.H.* A genetic and structural analysis of the N-glycosylation capabilities of rice and other monocotyledons // *Plant Mol. Biol.* 2004. V. 55. P. 631.
<https://doi.org/10.1007/s11103-004-1558-3>
72. *Wilson I., Zeleny R., Kolarich D., Staudacher E., Stroop C., Kamberling J., Altmann F.* Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core α 1,3-linked fucose and xylose substitutions // *Glycobiology.* 2001. V. 11. P. 261.
<https://doi.org/10.1093/glycob/11.4.261>
73. *Karki U., Fang H., Guo W., Unnold-Cofre C., Xu J.* Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production // *Plant Cell Rep.* 2021. V. 40. P. 1087.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02693-6>
74. *Van Beers M.M.C., Bardor M.* Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins // *Biotechnol. J.* 2012. V. 7. P. 1473.
<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201200065>
75. *De Coninck T., Gistelinc K., Janse van Rensburg H.C., Van den Ende W., Van Damme E.J.M.* Sweet modifications modulate plant development // *Biomolecules.* 2021. V. 11. P. 756.
<https://doi.org/10.3390/biom11050756>
76. *Qin C., Li Y., Gan J., Wang W., Zhang H., Liu Y., Wu P.* OsDGL1, a homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, is involved in N-glycosylation and root development in rice // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 129.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcs159>
77. *Lerouxel O., Mouille G., Andeme-Onzighi C., Bruyant M.-P., Seveno M., Loutelier-Bourhis C., Driouich A., Hofte H., Lerouge P.* Mutants in DEFECTIVE GLYCOSYLATION, an *Arabidopsis* homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein under glycosylation and defects in cell differentiation and growth // *Plant J.* 2005. V. 42. P. 455.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02392.x>
78. *Wang S.K., Xu Y.X., Li Z.L., Zhang S.N., Lim J.-M., Lee K.O., Li C.Y., Qian Q., Jiang D.A., Qi Y.H.* OsMOGS is required for N-glycan formation and auxin-mediated root development in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant J.* 2014. V. 78. P. 632.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12497>
79. *Gillmor C.S., Poindexter P., Lorieau J., Palcic M.M., Somerville C.* α -Glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis* // *J. Cell Biol.* 2002. V. 156. P. 1003.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200111093>
80. *Limkul J., Iizuka S., Sato Y., Misaki R., Ohashi T., Fujiyama K.* The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana*

- plants // Plant Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 1682.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12529>
81. Strasser R., Stadlmann J., Schähs M., Stiegler G., Quendler H., Mach L., Glössl J., Weterings K., Pabst M., Steinkellner H. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 392.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x>
 82. Rozov S.M., Permyakova N.V., Deineko E.V. Main strategies of plant expression system glycoengineering for producing humanized recombinant pharmaceutical proteins // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. P. 215.
 83. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K. Compendium on food crop plants as a platform for pharmaceutical protein production // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 3236.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063236>
 84. Margolin E., Verbeek M., de Moor W., Chapman R., Meyers A., Schäfer G., Williamson A-L., Rybicki E. Investigating constraints along the plant secretory pathway to improve production of a SARS-CoV-2 spike vaccine candidate // Front. Plant Sci. 2022. V. 12. P. 798822.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.798822>
 85. Shin Y.-J., König-Beihammer J., Vavra U., Schweska J., Kienzl N.F., Klausberger M., Laurent E., Grunwald-Gruber C., Vierlinger K., Hofner M., Margolin E., Weinhäusel A., Stöger E., Mach L., Strasser R. N-glycosylation of the SARS-CoV-2 receptor binding domain is important for functional expression in plants // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 689104.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689104>
 86. Liu H., Timko M.P. Improving protein quantity and quality – the next level of plant molecular farming // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1326.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031326>
 87. Parsons J., Altmann F., Arrenberg C.K., Koprivova A., Beike A.K., Stemmer C., Gorr G., Reski R., Decker E.L. Moss-based production of asialo-erythropoietin devoid of Lewis A and other plant-typical carbohydrate determinants // Plant Biotechnol. J. 2002. V. 10. P. 851.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00704.x>
 88. Castilho A., Gattinger P., Grass J., Jez J., Pabst M., Altmann F., Gorfer M., Strasser R., Steinkellner H. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans // Glycobiology. 2011. V. 21. P. 813.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwr009>
 89. Nagels B., Van Damme E. J., Pabst M., Callewaert N., Weterings K. Production of complex multiantennary N-glycans in *Nicotiana benthamiana* plants // Plant Physiol. 2011. V. 155. P. 1103.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.168773>
 90. Schneider J., Castilho A., Pabst M., Altmann F., Gruber C., Strasser R., Gattinger P., Seifert G.J., Steinkellner H. Characterization of plants expressing the human beta1,4-galactosyltransferase gene // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 92. P. 39.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.010>
 91. Kallolimath S., Castilho A., Strasser R., Grunwald-Gruber C., Altmann F., Strubl S., Galuska C.E., Zlatina K., Galuska S.P., Werner S., Thiesler H., Werneburg S., Hildebrandt H., Gerardy-Schahn R., Steinkellner H. Engineering of complex protein sialylation in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. V. 113. P. 9498.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604371113>
 92. Esqueda A., Chen Q. Producing biologics with defined N-glycosylation in plants // Chemokine-glycosaminoglycan interactions: methods and protocols / Ed. Lucas A.R. Humana Press. 2023. V. 2597. P. 235.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2835-5_17
 93. Fang P., Ji Y., Oellerich T., Urlaub H., Pan K.-T. Strategies for proteome-wide quantification of glycosylation macro- and micro-heterogeneity // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1609.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031609>
 94. Jeong I.S., Lee S., Bonkhofer F., Tolley J., Fukudome A., Nagashima Y., May K., Rips S., Lee S.Y., Gallois P., Russell W.K., Jung H.S., von Schaewen A., Koiwa H. Purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* oligosaccharyltransferase complexes from the native host: a protein super-expression system for structural studies // Plant J. 2018. V. 94. P. 131.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13847>
 95. Castilho A., Beihammer G., Pfeiffer C., Goritzner K., Montero-Morales L., Vavra U., Maresch D., Grunwald-Gruber C., Altmann F., Steinkellner H., Strasser R. An oligosaccharyl transferase from *Leishmania major* increases the N-glycan occupancy on recombinant glycoproteins produced in *Nicotiana benthamiana* // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1700.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12906>
 96. Vamvaka E., Twyman R.M., Murad A.M., Melnik S., Teh A.Y., Arcalis E., Altmann F., Stoger E., Rech E., Ma J.K., Christou P., Capell T. Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12 // Plant Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 97.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12360>
 97. Shen J.S., Busch A., Day T.S., Meng X.L., Yu C.I., Dabrowska-Schlepp P., Fode B., Niederkrüger H., Forini S., Chen S., Schiffmann R., Frischmuth T., Schaaf A. Mannose receptor-mediated delivery of moss-made α -galactosidase A efficiently corrects enzyme deficiency in Fabry mice // J. Inher. Metab. Dis. 2016. V. 39. P. 293.
<https://doi.org/10.1007/s10545-015-9886-9>
 98. Sariyatun R., Kajiura H., Limkul J., Misaki R., Fujiyama K. Analysis of N-glycan profile of *Arabidopsis alg3* cell culture // Plant Biotechnol. 2021. V. 38. P. 463.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.1025a>
 99. Margolin E., Oh Y.J., Verbeek M., Naude J., Pöndorf D., Meshcheriakova Y.A., Peyret H., van

- Diepen M.T., Chapman R., Meyers A.E., Lomonosoff G.P., Matoba N., Williamson A.L., Rybicki E.P.* Co-expression of human calreticulin significantly improves the production of HIV gp140 and other viral glycoproteins in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2109.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13369>
100. *Ruiz-May E., Thannhauser T.W., Zhang S., Rose J.K.C.* Analytical technologies for identification and characterization of the plant *N*-glycoproteome // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 150.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00150>
101. *Qin Sh., Qin S., Tian Z.* Progresses in mass spectrometry-based plant N-glycomics and N-glycoproteomics // *Int. J. Mass Spectrom.* 2022. V. 481. P. 116917.
<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116917>
102. *Trbojevic-Akmacic I., Lageveen-Kammeijer G.S.M., Heijs B., Petrovic T., Deris H., Wuhler M., Lauc G.* High-throughput glycomic methods // *Chem. Rev.* 2022. V. 122. P. 15865.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01031>