

酵母Dop1及其同源蛋白DOPEY对细胞糖基化和囊泡运输影响的研究

赵神保 藤田盛久*

(江南大学生物工程学院, 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要 蛋白质糖基化是一种保守的翻译后修饰, 对多种细胞现象至关重要。在酵母或动物细胞高尔基体中的糖链处理由结构相似的糖基转移酶或糖苷酶催化。囊泡运输等多种因素会影响糖基转移酶在高尔基体中的稳态定位, 进而影响糖基化。该研究探讨高尔基外周蛋白Dop1对细胞糖基化和囊泡运输的影响。共聚焦荧光显微镜活细胞成像显示, Dop1主要定位于晚期高尔基体。Dop1及其相互作用蛋白Neol(P4 ATPase)均参与高尔基体后期的囊泡运输。此外, Dop1介导糖基转移酶Och1的逆向运输而影响糖基化。进一步, 哺乳动物DOPEY1和DOPEY2是酵母Dop1的同源蛋白。DOPEY1或DOPEY2的缺失导致高尔基体结构的改变, 轻微地影响细胞糖基化。综上, 酵母Dop1和哺乳动物DOPEY都参与了细胞后期的蛋白质囊泡运输, 并影响高尔基体形态或糖基化。

关键词 Dop1; DOPEY; 高尔基体; 糖基化

Study of Yeast Dop1 and Its Homologous DOPEY Proteins on Cellular Glycosylation and Vesicular Transport

ZHAO Shenbao, FUJITA Morihisa*

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Protein glycosylation is a conserved post-translational modification that is critical for various cellular phenomena. Structure similar glycosyltransferases or glycosidases cooperate to modify glycan structures in the Golgi of yeast or mammalian cells. The steady state localization of glycosyltransferases in the Golgi apparatus is influenced by vesicular transport and a variety of factors. This study explored the effect of Golgi peripheral protein Dop1 on cellular glycosylation. Live cell imaging by confocal fluorescence microscopy showed that Dop1 was predominantly localized to the late golgi apparatus. Both Dop1 and its interacting protein Neol (P4-ATPase) were involved in vesicular trafficking at the late golgi apparatus. In addition, Dop1 mediated the retrograde transport of Och1 glycosyltransferase. Furthermore, deletion of the mammalian Dop1 homologs DOPEY proteins led to changes in the structure of the Golgi, which weakly affected the glycosylation. Our results indicated that both yeast Dop1 and mammalian DOPEYs were involved in protein transport at the late stage of vesicular trafficking pathway and affected Golgi morphology or glycosylation.

Keywords Dop1; DOPEY; golgi; glycosylation

收稿日期: 2019-12-02 接受日期: 2020-03-05

国家自然科学基金(批准号: 31770853、21778023)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85197071, E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

Received: December 2, 2019 Accepted: March 5, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770853, 21778023)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197071, E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5224>

在所有的生物体中蛋白质通常存在许多不同方式的修饰,其中最复杂的蛋白质修饰是蛋白质的糖基化。真核细胞主要有N-糖基化和O-糖基化这两种蛋白质糖基化:N-糖基化是指糖链与多肽链的共有序列Asn-X-Ser/Thr中的天冬酰胺残基共价结合,而O-糖基化通常是指糖链与肽链的Ser/Thr残基相连^[1]。N-糖基化的最初步骤是在内质网中完成的。寡糖基转移酶(oligosaccharyltransferase, OST)复合体将14个单糖组成的寡糖前体转移到新生肽链的天冬酰胺残基。肽链经过折叠和质量控制形成正确折叠的糖蛋白,其糖链也加工形成Man8GlcNAc2的结构,随后蛋白质通过囊泡运输从内质网进入高尔基体^[2]。在哺乳动物细胞中经过高尔基体驻留的糖基转移酶和糖苷酶的一系列作用下形成二天线复杂型等N-糖链结构^[3-4]。在酿酒酵母中,糖蛋白上的N-糖链首先在顺面高尔基体定位的Och1糖基转移酶的作用下形成一个 α -1,6-甘露糖的侧链,随后该侧链在其他糖基转移酶的作用下进一步延长,最终形成含有50~150甘露糖的庞大糖链^[5]。

糖基转移酶是一类定位于高尔基体的II型跨膜蛋白,在进化上显示出保守性^[6]。这些酶由短的细胞质定向的氨基末端、单个跨膜结构域和在高尔基体腔内的具有催化活性的结构域组成。这些糖基转移酶的表达量和亚细胞定位对蛋白质正确的糖基化起着重要作用。现在比较公认的高尔基组织模型是潴池成熟模型^[7],驻留在早期高尔基体的膜蛋白会从晚期高尔基体再循环,因此糖基转移酶驻留在高尔基体中被视为一种动态过程。例如Och1主要定位于顺面高尔基体,但在顺面高尔基体和反面高尔基体网络(trans-golgi network, TGN)之间循环^[8]。囊泡运输在不同程度上有助于糖基转移酶驻留蛋白在特定高尔基体小室中的稳态定位^[6]。当囊泡运输受到破坏时,糖基转移酶稳态定位就会受到影响。例如,在酿酒酵母中,Vps74识别一些甘露糖基转移酶的胞质尾部,并且能够与COPII包被蛋白相互作用,介导糖基转移酶在高尔基体内的逆向运输^[9-10]。在vps74敲除细胞中,许多糖基转移酶错误定位在液泡中并被降解,进而导致糖基化的缺陷。在动物细胞中,COPI(coat protein complex I)包被蛋白能直接识别糖基转移酶的胞质尾部介导其在高尔基体内的逆向运输^[11]。尽管已知多种蛋白的缺失影响糖基转移酶的稳态定位,但仍然存在未知的机制来调节其定位。

Dop1作为一个定位于高尔基体的外周蛋白^[12-13],其具体功能未知。本课题组最近的研究中发现,Dop1缺陷会导致顺面高尔基体定位的糖基转移酶Och1错误地定位到反面高尔基体网络,进而导致蛋白质严重的糖基化缺陷^[14]。在本研究中,通过共聚焦荧光显微镜活细胞成像,排除非焦点荧光的干扰,进一步确定了Dop1-GFP定位于晚期高尔基体。通过分析蔗糖酶的分泌和Snc1蛋白的循环确定了Dop1和其相关蛋白Neo1在囊泡运输中起作用。同时发现,Dop1与糖基转移酶Och1存在相互作用,推测其介导了Och1的逆向运输。进一步发现分别敲除哺乳细胞中的Dop1同源蛋白(DOPEY1、DOPEY2)影响细胞高尔基结构,导致细胞糖基化的轻微改变。

1 材料与方法

1.1 酵母菌株和质粒

野生型酵母W303a和BY4741为本实验保藏。酵母菌株在YPAD(1%酵母提取物、2%蛋白胨、0.003%腺嘌呤、2%葡萄糖),SD(0.67%无氨基酵母氮源、2%葡萄糖和必需氨基酸)和SG培养基(0.67%无氨基酵母氮源、2%半乳糖和必需氨基酸)上生长。酵母的基因敲除和蛋白标记是基于PCR的方法^[15]。本研究游离型质粒通过酵母一步转化法转入酵母,整合型质粒在线性化后通过醋酸锂转化法转入酵母,之后涂布于合适的筛选平板。本研究使用菌株和质粒见表1。质粒构建参考[14]。

1.2 试剂及抗体

小鼠抗FLAG、抗HA、抗GFP抗体、抗Tubulin购于北京全式金生物技术有限公司。抗LAMP2(#49067)购于美国Cell Signaling Technology公司。抗GLUT1(#ab115730)购于艾博抗(上海)贸易有限公司。抗GAPDH购于武汉三鹰生物技术有限公司(Proteintech Group)。抗Giantin(#ab37266)购于艾博抗(上海)贸易有限公司。抗Golgin-97(#97537)购于美国Cell Signaling Technology公司。蛋白免疫印迹二抗山羊抗小鼠IgG辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和山羊抗兔IgG-HRP购于北京全式金生物技术有限公司。内切糖苷酶H(Endo H)购于美国New England Biolabs公司(#P0702S)。共聚焦显微镜检测的抗兔或小鼠IgG Alexa Fluor染料偶联的二抗购于赛默飞世尔科技有限公司。FITC标记的凝集素购于日本J-Oil Mills公司。其他试剂均为

表1 本研究的酵母菌株和质粒
Table 1 Strain and plasmid used in this study

菌株 Strain	基因型 Genotype	来源 References
W303-1a	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Laboratory strain
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Laboratory strain
1	<i>DOP1-6xiGFP</i> in W303-1a+YIplac211-DOP1-6xiGFP	This study
2	<i>DOP1-6xiGFP</i> in W303-1a+pRS304-TEFpr-mRFP-SED5	This study
3	<i>HIS3MX6::P_{GAL1}-NEO1</i> in BY4741	This study
4	<i>HIS3MX6::P_{GAL1}-DOP1</i> in BY4741	This study
5	<i>rcy1Δ::kanMX6</i> in BY4741	This study
6	<i>dop1Δ::HIS3MX6+pRS314DOP1-3HA</i>	This study
7	<i>dop1Δ::HIS3MX6+pRS314DOP1-3HA</i> in W303-1a+pRS315-ADH1pr-EGFP-NEO1	This study
8	<i>dop1Δ::HIS3MX6+pRS314DOP1-3HA</i> in W303-1a+pRS315-OCH1-EGFP	This study
9	<i>dop1Δ::HIS3MX6+pRS314DOP1-3HA</i> in W303-1a+pRS314-ADH1pr-GFP-VPS21	This study

国产分析纯。

1.3 动物细胞系培养和构建

HEK293和HeLa细胞系由实验室保藏。细胞培养于DMEM培养基中,内含10%灭活新生小牛血清及100 μg/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,置于37 °C、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。根据标准实验步骤,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)进行质粒DNA的转染。为了获得基因敲除的细胞系,用带有靶序列的pX330-EGFP质粒瞬时转染细胞。3天后,用细胞分选仪S3(Bio-Rad Laboratories)分选具有EGFP信号的细胞。将收集的细胞培养超过7天,并进行有限稀释以获得单克隆的敲除细胞。经过基因组PCR,选择没有野生型等位基因的克隆。测序分析敲除细胞DNA序列。

1.4 酵母活细胞和动物细胞共聚焦成像

将酵母细胞生长至对数中期的中期,收获并重新悬浮在SD培养基中。将细胞避光保存在冰上,并立即通过配备60×/1.4 NA油物镜和白激光激光器的倒置共聚焦荧光显微镜Leica SP8观察。选取合适的区域,每隔1.5 s拍摄一次。图像后期使用ImageJ处理。

在室温下用0.1%明胶(#G7041,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)盖住培养皿15 min,然后将多余的明胶完全吸去。按照指示进行转染后,将合适的细胞接种到带有无菌玻璃盖玻片的24孔板中,并在正常培养基中生长。当细胞密度达到约60%融合时,用-20 °C的冷甲醇固定细胞10 min。PBS液清洗

1次,封闭缓冲液(#P0260,碧云天有限公司)室温下封闭10 min。吸出封闭液加一抗置于4 °C冰箱孵育过夜。PBS缓冲液(pH8.0)洗3次后避光加二抗室温孵育1 h后封片。在共聚焦显微镜(Nikon C2)下观察并拍照。

1.5 蛋白免疫印迹

酵母蛋白的提取方法为接新鲜平板上单克隆的酵母细胞至相应的液体培养基,过夜振荡培养后,转接适量细胞培养液至含20 mL新鲜培养基的摇瓶中,继续培养约8 h,直至 D_{600} 达到0.8~1.0。3 000 ×g离心5 min收集细胞。用TEG缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA)洗涤细胞1次,再次离心收集细胞。重悬浮细胞于100 μL TEG裂解缓冲液(TEG缓冲液、1×蛋白酶抑制剂、1 mmol/L PMSF, 1% NP-40)。加入直径为0.5 mm的玻璃珠(#G8772,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)至与缓冲液面齐平。高速振荡1 min,冰上放置1 min,进行10个循环。在离心管底部钉1个小口,低速离心,收集裂解液。将裂解液于4 °C下15 000 ×g离心5 min,避开沉淀取上清。动物细胞蛋白的提取方法为收集1×10⁵个细胞, PBS温柔清洗1次。重悬浮细胞于100 μL TEG裂解缓冲液(TEG缓冲液、1×蛋白酶抑制剂、1 mmol/L PMSF、1% NP-40),冰上裂解20 min。将裂解液于4 °C下15 000 ×g离心5 min,避开沉淀取上清。

使用BCA蛋白浓度检测试剂盒检测样品浓度,加入5×上样缓冲液,95 °C加热5 min,

于 -20°C 保存样品。样品加入到配好的SDS-PAGE蛋白胶(一般为8%),先电泳电压80 V,时间30 min,随后电压120 V,时间1.5 h。使用半干法转膜将蛋白样品转移到活化后的PVDF膜。结束转膜,将膜置于杂交袋中,加入含5%脱脂牛奶的TBST,排除气泡,室温封闭1 h。结束封闭后,将膜在TBST[10 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、150 mmol/L NaCl、0.05%(V/V) Tween-20]中清洗3 min,小心夹取膜放置于新的杂交袋,加入一抗溶液(用5%脱脂牛奶稀释,稀释倍数为1:5 000),室温孵育2 h。一抗结合后,将膜用TBST清洗3遍,第一次5 min,之后每次10 min。小心夹取膜放置于新的杂交袋,加入二抗溶液(用5%脱脂牛奶稀释,稀释倍数为1:5 000),室温孵育1 h。结束抗体孵育后,将膜用TBST清洗3遍,每次10 min,显色并拍照。

1.6 TCA沉淀蛋白

使用三氯乙酸(TCA)对培养基中低浓度的分泌蛋白进行浓缩。取酵母细胞悬液于 4°C 下, $4\ 500 \times g$ 离心5 min,吸取上清液。在上清中加入浓度为100%的TCA溶液,使TCA终浓度为10%。充分混匀溶液,于 4°C 下过夜放置。在 4°C 下, $21\ 500 \times g$ 离心5 min,弃上清。用冰冻丙酮洗涤沉淀,离心去上清。沉淀中加入上样缓冲液混匀, 95°C 加热5 min,于 -20°C 保存样品。

1.7 酵母细胞免疫共沉淀

收集 $D_{660}=20.0$ 的酵母菌,细胞重悬于500 μL TEG裂解缓冲液(TEG缓冲液、 $1\times$ 蛋白酶抑制剂、1 mmol/L PMSF、1% NP-40)。加入直径为0.5 mm的玻璃珠至与缓冲液面齐平。高速振荡1 min,冰上放置1 min,进行10个循环。将裂解液于 4°C 下 $15\ 000 \times g$ 离心5 min,避开沉淀取上清。取少部分上清加入 $5\times$ 上样缓冲液作为免疫共沉淀前的样品。在剩余的上清中加入20 μL 的Anti-HA琼脂糖珠并在 4°C 旋转1 h。之后用PBS温柔地清洗4次,加入 $5\times$ 上样缓冲液, 50°C 加热10 min,作为免疫共沉淀后的样品。

1.8 流式细胞仪检测凝集素染色

培养细胞至细胞状态稳定。收取 1×10^6 个细胞,用1 mL PBS洗涤1次, 4°C 、 $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心3 min。使用1%稀释于FACS缓冲液(1.0% BSA、0.1% NaN₃的PBS液)的凝集素-FITC染色,冰上避光放置15 min。用1 mL PBS洗涤3次,用适量PBS重悬细胞,控制细胞终浓度约为 1×10^4 个/mL。将细胞悬液样品置于

冰上以维持细胞活性,用于分析。本研究中采用BD Accuri C6流式细胞分析仪的FL1(515/30 nm)通道分析代表凝集素结合水平的FITC绿色荧光信号。

1.9 蔗糖酶活性分析

蔗糖酶活性分析法根据文献做少许改变^[16]。表达Invertase-FLAG的野生型、GALpDOP1和GALp-NEO1的菌株在YPAD中培养16 h。收集 $D_{660}=1.0$ 的细胞。PBS清洗1次后放置于冰上。加入50 μL 50 mmol/L Na Acetate(pH5.1)的缓冲液和0.5 mol/L纯蔗糖,在 30°C 下反应10 min。根据葡萄糖(GO)检测试剂盒(Glucose Assay Kit, #GAGO20, Sigma)测量葡萄糖浓度。用540 nm的吸光度值与葡萄糖标准曲线比较来测定葡萄糖浓度。蔗糖酶活性为每 10^6 个细胞每分钟转化 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 葡萄糖。

2 结果

2.1 酵母Dop1定位于晚期高尔基体

在酿酒酵母中,DOP1基因编码的Dop1是一个1 698个氨基酸的必需蛋白质,预计编码195 kDa的胞质蛋白^[12]。因其与丝状真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的DopA蛋白同源而得名^[17]。在不同物种中与DopA同源的蛋白其N-端和C-端区域高度保守,并且C-端包含两个亮氨酸拉链结构域(被称为Dopey)。Dop1蛋白在真核生物中高度保守。例如,芽殖酵母(Dop1)、秀丽隐杆线虫(Pad-1)、黑腹果蝇(CG15099)、哺乳动物(DOPEY1, DOPEY2)。之前的研究表明,Dop1似乎在高尔基体和内涵体之间的运输起作用^[12-13],但其具体功能未知。

虽然Dop1没有跨膜域,但是其能结合细胞膜,并且大致定位于高尔基体或内涵体^[13]。最近研究表明,酿酒酵母缺乏早期内涵体^[18]。酵母TGN发挥等同于哺乳动物细胞中早期和循环内涵体的功能。根据潞池成熟模型和最近的研究,高尔基体分为早期高尔基体和晚期高尔基体^[19-20]。早期高尔基体包含cis-到medial-的潞池,晚期高尔基体主要是指trans-和TGN潞池,其中TGN包含早期TGN和晚期TGN。在之前的研究中,本课题组通过在荧光显微镜下活细胞成像观察Dop1-GFP与顺面高尔基体标记蛋白Sed5和反面高尔基体网络TGN标记蛋白Sec7的动态变化,以及与早期TGN标记蛋白Kex2的高度共定位,发现Dop1主要定位于早期TGN(younger TGN)^[14]。为了进一步确认这一结果,为排除荧光显微镜下非

焦面的荧光的干扰, 本研究使用共聚焦显微镜观察酵母活细胞Dop1-GFP定位。

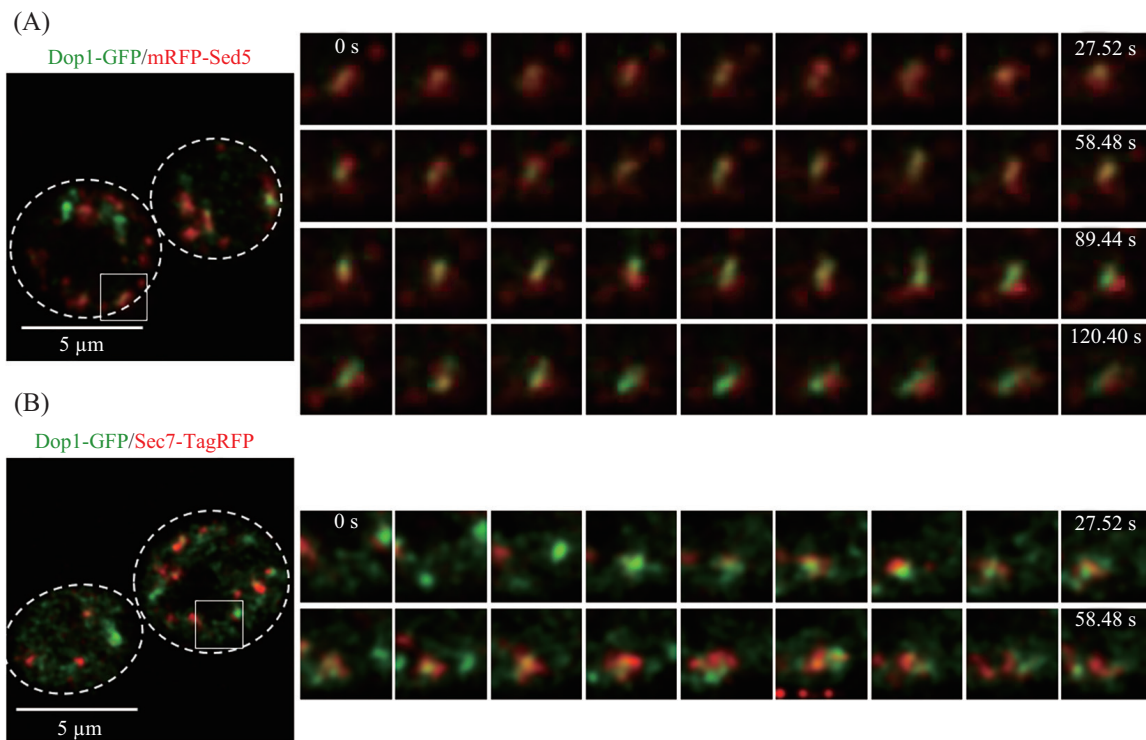
如图1A所示, 在共聚焦显微镜的同一光学焦面下, mRFP-Sed5标记的顺面高尔基体逐渐转变为Dop1-GFP阳性的高尔基潴池。相似地, Dop1-GFP阳性的高尔基潴池逐渐转变为Sec7-TagRFP标记的晚期TGN(图1B)。同时, 可以观察到高尔基潴池Sed5转变为Dop1所需的时间比从Dop1转变为Sec7要长, 说明Dop1主要定位于整个高尔基体的后期, 略早于晚期TGN, 属于晚期高尔基体。这与之前的结果是一致的。

2.2 Dop1和Neo1参与晚期高尔基体的囊泡运输

据报道, Dop1参与组成Dop1-Neo1-Mon2蛋白复合物^[12]。Neo1属于P4-ATP酶家族。P4-ATP酶(flippases)是膜结合泵的进化上保守的P型ATP酶家族的成员^[21]。在活细胞的细胞膜上磷脂呈现非对称性分布, 其主要是由P4类ATP水解酶维持的。这些

翻转酶中的许多位于高尔基体、内涵体膜和细胞质膜内。在酵母中Drs2是最早也是唯一一个在体外被证明是具有PS翻转酶活性的P4-ATP酶^[22]。Neo1是唯一的必需蛋白, 但其底物并不清楚。据报道, Neo1可能催化磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)从细胞膜的外质细胞向胞质细胞的转运^[23-24]。P4-ATP酶的磷脂翻转活性可驱动膜弯曲, 同时可招募特异的磷脂结合蛋白, 如含有BAR结构域的蛋白^[25]。所以P4-ATP酶在细胞膜的重塑和运输囊泡的生成中起重要作用。

*DOP1*和*NEO1*是必需基因, 因此本研究构建了半乳糖GAL1启动子调节的菌株, 分别为GALp-*DOP1*和GALp-*NEO1*。通过葡萄糖抑制GAL1启动子可以调节这些基因的表达(图2A)。所以菌株在半乳糖平板上生长, 而不能在葡萄糖平板上生长。然而, 在葡萄糖液体培养基中, 细胞仍然可以增殖。



A、B: 在囊泡成熟中观察Dop1-GFP。野生型酵母在内源染色体座后表达Dop1-6xiGFP, 分别转化pRS304-mRFP-Sed5或pRS304-Sec7-4xTagRFP。酵母细胞在23 °C的基本培养基中避光生长至对数中期, 并通过共聚焦荧光显微镜观察。虚线表示酵母的边缘。代表性图像显示在左边, 右边显示左边细胞正方形区域约每3 s拍摄的动画。

A,B: observation of Dop1 during cisternal maturation. Wild-type cells expressing Dop1 tagged with GFP (Dop1-6xiGFP) at the endogenous chromosomal locus were transformed with pRS304-mRFP-Sed5 or pRS304-Sec7-4xTagRFP. Cells grown to mid-logarithmic phase in synthetic medium at 23 °C and observed by confocal fluorescence microscopy. Dashed lines indicated the edge of the cells. A representative image was shown in the left panel. The right panels show time-lapse images of cisternae, indicated with square area in left, taken every 3 s.

图1 活细胞共聚焦显微镜成像观察Dop1-GFP

Fig.1 Observation of Dop1-GFP under confocal microscope in live-cell imaging

蔗糖酶是一种高度糖基化的蛋白, 分泌到酵母周质和胞外空间, 特异性地水解蔗糖^[26]。在本课题组之前的研究中发现, 关闭*DOPI*和*NEO1*的表达均会导致蔗糖酶N-糖基化的缺陷^[14]。接下来, 本研究探究了关闭*DOPI*和*NEO1*的表达对蔗糖酶分泌的影响。蔗糖酶的分泌途径是从内质网经过高尔基体再分泌到细胞外的过程。Dop1和Neo1的高尔基体定位及其在囊泡形成中的功能表明, 其可能影响蔗糖酶的分泌。通过TCA沉淀培养基中的蔗糖酶后经蛋白免疫印迹分析, 如图2B和图2C所示, 在关闭*DOPI*和*NEO1*的表达后, 与野生型细胞相比, 分泌到培养基中的蔗糖酶明显减少。同时本研究检测了野生型、*DOPI*-Shutdown和*NEO1*-Shutdown菌株在YPAD中预培养16 h后分泌的蔗糖酶的酶活(图2D)。与野生型细胞相比, 在关闭*DOPI*和*NEO1*的表达后, 分泌的蔗糖酶的酶活降低, 说明分泌的蔗糖酶的量变少。由图2C和图2D可知, 相比于关闭*DOPI*的表达, 关闭*NEO1*的表达对蔗糖酶的分泌具有更严重的阻碍。Dop1在线虫的同源物是PAD-1, Neo1在线虫中的同源物是TAT-5。据报道, PAD-1参与调节TAT-5的翻转活性^[27]。因此, Dop1可能在Neo1的翻转活性中起辅助作用, 所以关闭*NEO1*的表达具有更严重的影响。

下一步, 本研究使用这些菌株分析了v-SNARE Snc1的定位。它在细胞质膜、高尔基体和内涵体之间循环^[28]。在野生型细胞中, Snc1主要位于质膜上。Rcy1蛋白的缺失会导致Snc1聚集在细胞内部^[29]。在*NEO1*关闭和*DOPI*关闭的细胞中, 可以观察到细胞质膜上的Snc1减弱, 同时在*NEO1*关闭的细胞中, 与*rcy1*敲除细胞相同, Snc1聚集在细胞内部(图2E)。综合这些结果, 与先前的报道一致, Dop1和Neo1参与了晚期高尔基的蛋白运输。

2.3 Dop1介导Och1的逆向运输

因为Dop1参与晚期高尔基的囊泡运输, 并且Dop1的缺失影响Och1定位^[14]。为了进一步了解Dop1对糖基转移酶逆向运输的机制, 我们直接利用免疫共沉淀的方法, 探究Dop1和糖基转移酶Och1之间是否存在相互作用。如图3所示, 由于Dop1-Neo1-Mon2形成蛋白复合物, Dop1与Neo1存在明显的共沉淀。相比于对照蛋白Vps21, Dop1与Och1存在比较明显的共沉淀, 说明Dop1很可能与Och1相互作用, 因此介导Och1的逆向运输。

2.4 DOPEY1和DOPEY2的敲除对蛋白N-糖基化的影响

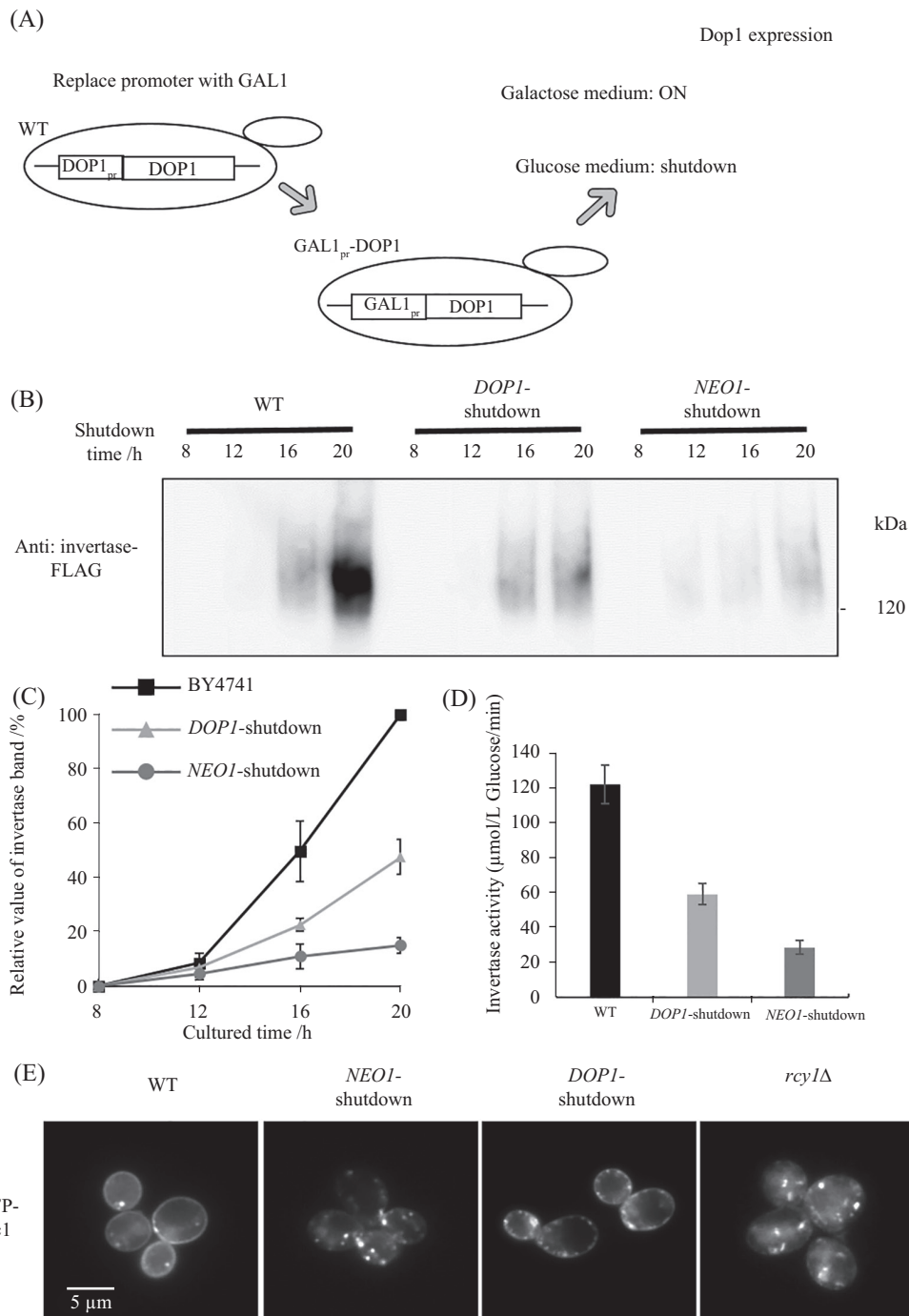
在酵母细胞中Dop1对糖基化的影响促使我们探究其同源蛋白在动物细胞内是否具有相似的现象。通过CRISPR-CAS9技术, 本研究在HEK293细胞中获得了*DOPEY1*、*DOPEY2*单独敲除的细胞和双敲的细胞(D-KO)。溶酶体相关膜蛋白2(lysosome-associated membrane protein 2, LAMP2)是定位于溶酶体高度糖基化的膜蛋白^[30]。在本研究室构建的甘露糖苷酶MAN1A1、MAN1A2和MAN1B1的三敲细胞中^[31], LAMP2仅含有高甘露糖型糖链, 因此在高甘露糖型糖苷酶Endo H的处理下, 如图所示, LAMP2条带迁移到40 kDa(图4A)。然而, LAMP2的条带在野生型和D-KO细胞中没有明显区别。之后, 我们检测了另一种糖基化蛋白GLUT1, 其定位于细胞膜, 含有一个N-糖基化位点^[32]。遗憾的是, GLUT1的糖基化水平在四株细胞中(WT、*DOPEY1* KO、*DOPEY2* KO和D-KO)没有明显区别(图4B)。

2.5 DOPEY敲除影响O-糖基化末端唾液酸的合成

相比于检测单一蛋白糖基化水平的变化, 本研究使用凝集素来检测细胞膜表面整体的蛋白糖基化水平。凝集素是来源于植物、无脊椎动物等的一类糖蛋白, 具有识别糖蛋白上特定结构的能力^[33]。本研究使用的凝集素带有异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记, 当凝集素与相应识别的目标糖链结构结合存在强弱时, 可以通过流式细胞仪检测到荧光强度的变化。通过所得到的结果可以计算样品与凝集素的结合情况, 荧光强度对应于流失细胞分析仪中的峰的Mean值(图5A)。通过计算四株细胞中Mean值的相对变化可以得出相对荧光强度的结果(图5B)。由结果可知, *DOPEY*的敲除对凝集素染色的强度有轻微的改变。其中, ABA凝集素可识别O-糖基化糖型末端的半乳糖和N-糖基化糖型末端N-乙酰半乳糖胺^[34], 在*DOPEY*敲除的细胞中有明显的提高。说明在*DOPEY*敲除的细胞中例如唾液酸等末端糖链的添加可能受到了影响。

2.6 DOPEY1和DOPEY2敲除影响高尔基体结构

根据凝集素染色的结果, 推测出*DOPEY*可能影响末端唾液酸的添加。因此, 本研究分析了唾液酸转移酶在*DOPEY1*和*DOPEY2*敲除细胞中的定位。Golgin-97是*trans*-/TGN的标记蛋白^[35]。如图6A所示, 在HeLa野生型细胞中, 瞬时表荧光蛋白标

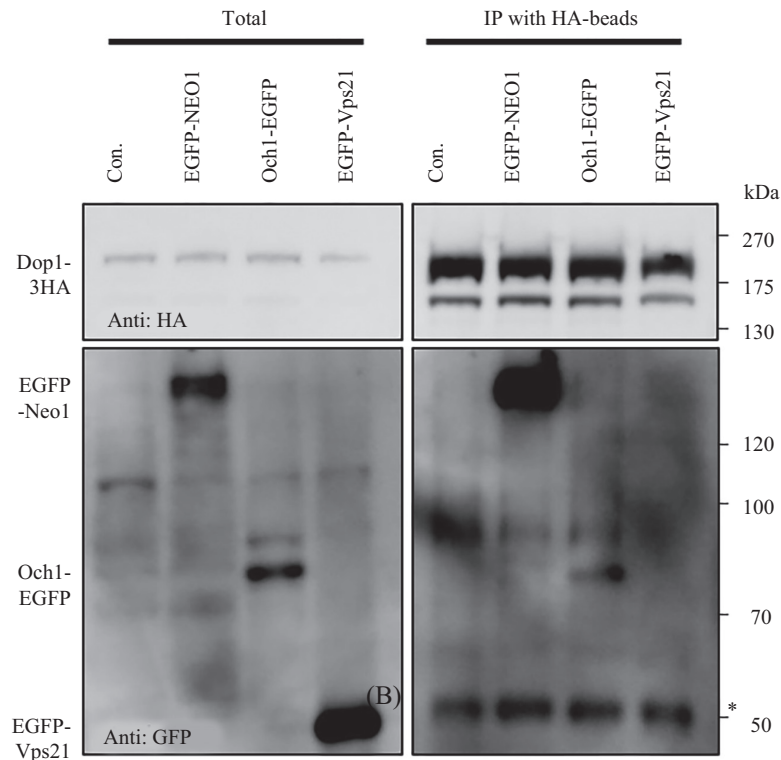


A: 葡萄糖抑制性GAL1启动子调节*DOP1*和*NEO1*的表达示意图。B: 蛋白免疫印迹分析分泌到细胞培养基中的蔗糖酶随时间的变化。野生型酵母、GALp*DOP1*和GALp*NEO1*酵母分别转化pRS316-TPIp-SUC2-FLAG。细胞先在半乳糖培养基中培养过夜,之后转移到葡萄糖培养基中培养如图显示的时间。收集1 mL培养基并按TCA沉淀法沉淀。C: 通过ImageJ量化图片B中蔗糖酶的量。D: 通过蔗糖酶活性分析量化野生型、GALp*DOP1*和GALp*NEO1*酵母细胞表面蔗糖酶的量。E: EGFP-Snc1的定位。细胞在葡萄糖培养基中关闭*DOP1*和*NEO1*的表达约16 h后在荧光显微镜下拍摄。

A: diagram of expression of *DOP1* and *NEO1* regulated by glucose-suppressed GAL1 promoter. B: changes of invertase secreted into cell culture medium at indicated time were detected by Western blotting. Wild type, GALp*DOP1* and GALp*NEO1* cells were transformed with pRS316-TPIp-SUC2-FLAG, respectively. The cells were cultured overnight in galactose medium and then transferred to glucose medium as indicated time. 1 mL culture medium was collected and precipitated by TCA precipitation method. C: the amount of invertase in B was quantified by ImageJ. D: quantification of cell surface invertase levels in wild-type, GALp*DOP1* and GALp*NEO1* cells by the invertase activity assay. E: localization of EGFP-Snc1. The expression of *DOP1* and *NEO1* was shutdown in glucose medium for about 16 hours and then imaged under fluorescence microscope.

图2 *Dop1*和*Neo1*参与晚期高尔基的膜运输。

Fig.2 *Dop1* and *Neo1* are involved in membrane trafficking of late-Golgi

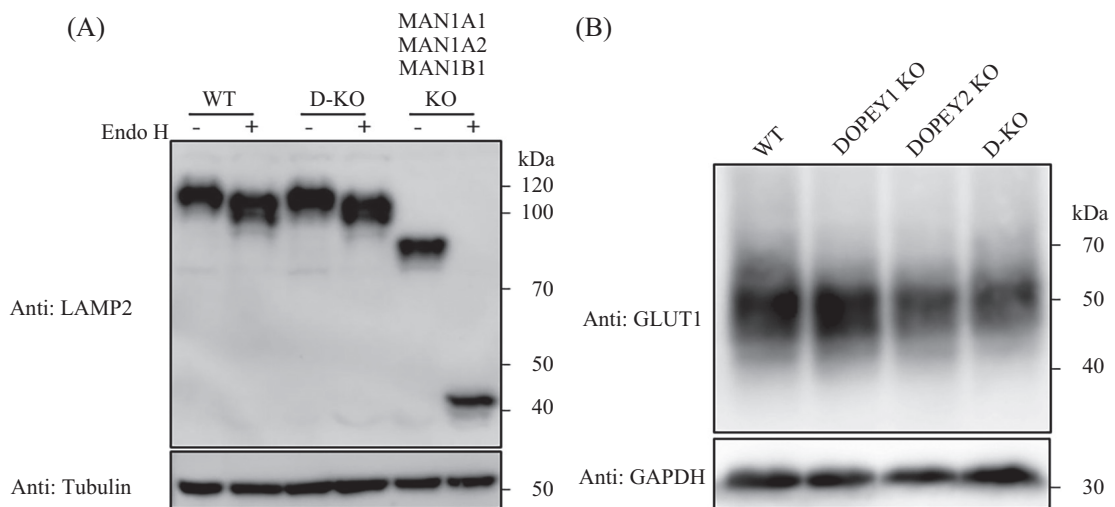


免疫共沉淀分析Dop1与Neo1、Och1和Vps21的相互作用。星号代表抗体重链。

The interaction of Dop1 with Neo1, Och1 and Vps21 was analyzed by Western blot. *: heavy chain of immunoglobulin.

图3 Dop1与Och1存在相互作用

Fig.3 Interaction between Dop1 and Och1



A: 蛋白免疫印迹检测Endo H处理前后LAMP2。B: 蛋白免疫印迹检测GLUT1。Tubulin(A)和GAPDH(B)作为内参蛋白。

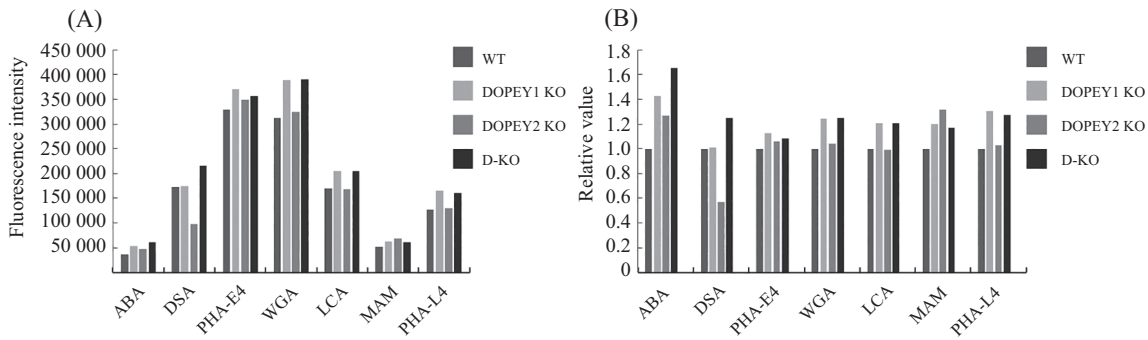
A: LAMP2 was detected by Western blot before and after Endo H treatment. B: GLUT1 was detected by Western blot. Tubulin (A) and GAPDH (B) were used as loading control, respectively.

图4 敲除DOPEY对LAMP2和GLUT1的糖基化的影响

Fig.4 Effect of DOPEY knockout on glycosylation of LAMP2 and GLUT1

记的 α -2,3唾液酸转移酶(alpha-2,3-sialyltransferase 1, ST-mRFP)与细胞内源Golgin-97存在高度定位,同时高尔基体也紧凑地聚集在细胞近核区。然而,在

DOPEY1和DOPEY2敲除细胞中,尽管唾液酸转移酶与Golgin-97也存在较高的共定位,但高尔基体的形态呈现出碎片状、远离细胞核等明显变化。为了确



A: 通过流式细胞仪检测WT、DOPEY1 KO、DOPEY2 KO和D-KO细胞7种凝集素的荧光强度。B: 显示图A荧光强度变化的相对值

A: WT, DOPEY1 KO, DOPEY2 KO and D-KO (HEK293) cells were stained with seven FITC-conjugated lectins and analyzed by flow cytometry. Fluorescence intensity was calculated. B: relative fluorescence intensity of Figure A (value in WT was set as 1) were shown.

图5 凝集素染色分析细胞表面糖链

Fig.5 Analysis of glycan on cell surface by lectin staining

定DOPEY1和DOPEY2敲除对高尔基体结构的影响,本研究另外检测了高尔基体标记蛋白Giantin的形态。如图6B,同样观察到高尔基体结构呈现碎片化的趋势。综上所述,DOPEY1和DOPEY2可能参与维持高尔基体的结构,进而影响动物细胞的糖基化。

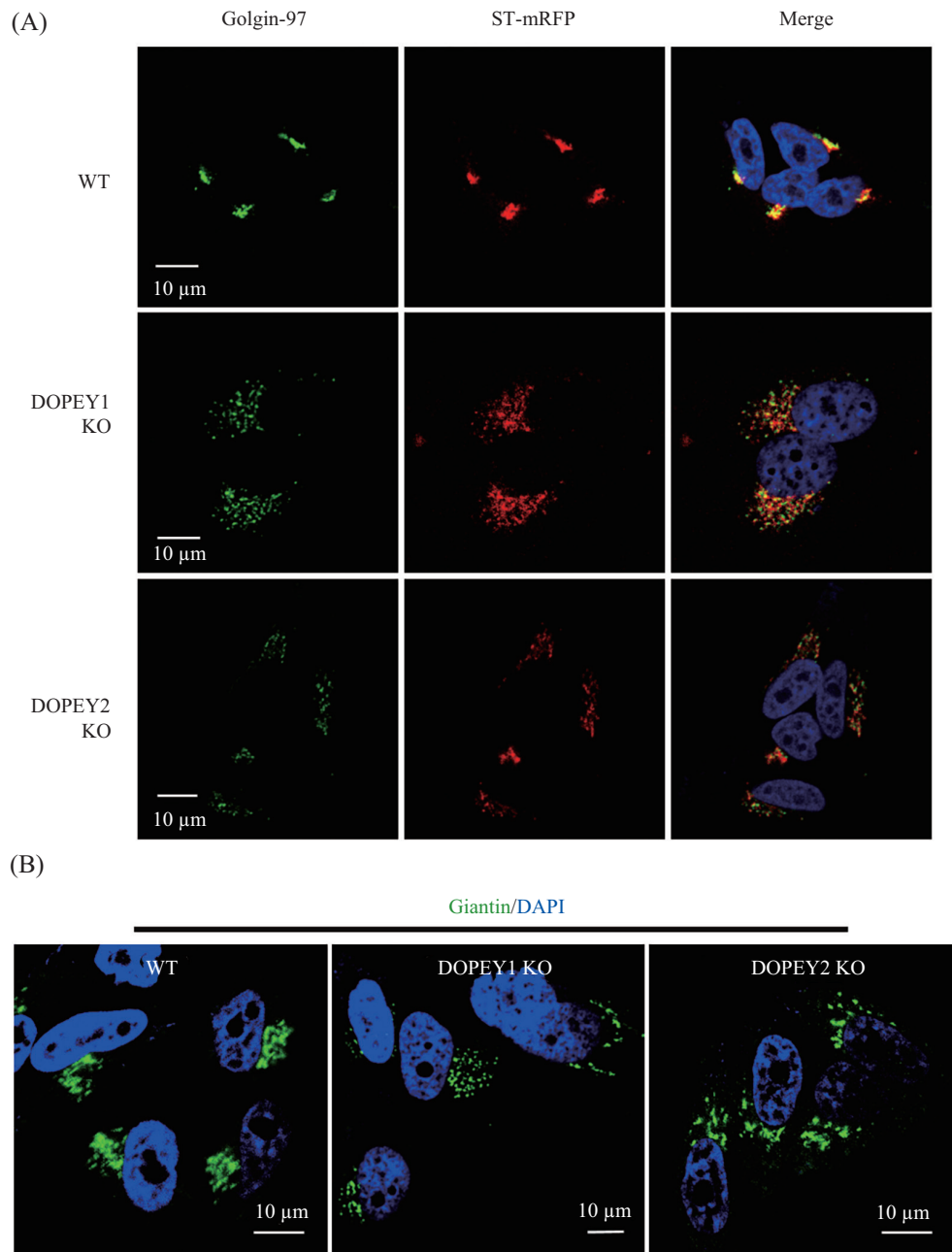
3 讨论

糖基化作为真核细胞蛋白质翻译后修饰的主要形式之一,具有增加蛋白质的稳定性和调节蛋白质活性等作用,主要参与细胞间识别、信号传导、免疫应答等重要的细胞功能。在真核细胞内,糖基化的形式主要包括连接于天冬酰胺(Asn)残基的酰胺氮的N-连接糖链(即N-糖基化)、连接于丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基羟基氧的O-连接糖链(即O-糖基化)等^[1]。N-糖基化起始于内质网,完成于高尔基体。其中内质网途径在各类真核细胞中保守性较高,酵母、植物和动物细胞都共有一致的Alg糖基转移酶和OST寡糖转移酶复合体^[2]。在高尔基体内,由于高尔基体结构的差异和含有不同的糖基化转移酶,糖基化的形式展现出极大的差异^[3]。然而,真核细胞的糖基转移酶具有相似的结构^[6],囊泡运输对其的影响具有保守性。通过普通荧光显微镜我们发现,一个功能未知的必需蛋白Dop1,定位于年轻的反面高尔基体网络即早期TGN^[14]。在关闭DOPI表达的细胞中观察到一般性糖基化缺陷,包括N-和O-聚糖修饰缺陷。尤其是在关闭DOPI表达的细胞中,Och1从顺式高尔基体错误定位到TGN^[14]。这说明,在晚期高尔基体中存在介导糖基转移酶逆向运输的机制。

传统荧光显微镜不仅从焦平面上收集光量,而且来自焦平面上方或下方的散射荧光也被物镜所接收,所以焦平面以外的荧光结构模糊、发虚。激光共聚焦显微镜用激光作为光源,采用共轭聚焦原理和装置,利用针孔成像,可以排除焦平面上焦点以外及非焦平面杂散光的影响^[36]。由于酿酒酵母的细胞为球形或者卵形,直径5~10 μm。在传统荧光显微镜下,虽然两个荧光显示共定位,但是两个蛋白可能在完全不同的焦面。本研究通过活细胞共聚焦荧光显微镜观察Dop1在高尔基体囊泡成熟中的变化,发现其位于顺面高尔基体到晚期TGN潴池变化的中间偏后部分,进一步确定了Dop1定位于晚期高尔基体。

尽管不清楚Dop1的具体功能,但Dop1与Neo1存在相互作用。NEO1是酵母P4-ATPase家族中唯一的必需基因。Neo1产生PE/PS膜的不对称性,并参与运输囊泡的形成^[12]。因此Dop1很可能起辅助作用从而参与囊泡的形成。在NEO1关闭和DOPI关闭的细胞中,蔗糖酶的分泌减少,细胞质膜Snc1蛋白的循环受到阻碍,确定了它们在囊泡运输中起作用。为了探究Dop1的作用机制,我们尝试验证Dop1与Och1是否存在相互作用。尽管我们不确定是直接还是间接作用,但结果暗示,Dop1可能参与Och1等糖基转移酶在晚期高尔基体的识别或包装过程。未来需要鉴定在晚期高尔基体参与识别Och1的复合物,及其与Dop1的相互关系。

在哺乳动物细胞中,有两个Dop1同源蛋白,即DOPEY1和DOPEY2。据报道^[37],其定位于高尔基体,但是具体定位于哪个高尔基体区室并不清楚。其中DOPEY1-MON2复合体与马达蛋白Kinesin-1结合,



A: 分别在WT、DOPEY1 KO和DOPEY2 KO细胞转化ST-mRFP, 抗内源Golgin-97作为反面高尔基体标记蛋白。B: 在WT、DOPEY1 KO和DOPEY2 KO细胞中抗内源Giantin作为高尔基体标记蛋白。

A: ST-mRFP construct was transfected into WT (HeLa), DOPEY1 KO and DOPEY2 KO cells, and endogenous Golgin-97 was used as the *trans*-Golgi marker protein. B: anti endogenous Giantin was used as the Golgi marker protein in WT, DOPEY1 KO and DOPEY2 KO cells.

图6 共聚焦显微镜检测唾液酸转移酶的定位

Fig.6 Localization of sialyltransferase by confocal microscopy

参与从高尔基体到细胞膜的囊泡运输。在本研究中, 尽管酵母中Dop1的缺陷表现出明显的糖基化缺陷, 而在动物细胞中DOPEY1和DOPEY2的缺失没有导致糖蛋白LAMP1和GLUT1糖基化水平的明显变化。这可能是由于酵母和动物细胞中高尔基体结构的不同而导致的^[38]。在酿酒酵母中, 高尔基体没有

堆叠, 而是散布在细胞质中, 囊泡成熟过程中可能伴随着同型和异型融合。而在动物细胞中具有一个巨大的高尔基体堆叠, 其连接成带状结构, 靠近中心体的近核位置或微管组织中心。高尔基体结构模型在动物细胞内也存在争议。最近的研究表明, 高尔基体的糖基转移酶优先定位于早期高尔基体潴池的内

部^[39]。这种相对固定的结构可能导致敲除DOPEY1、DOPEY2对糖基转移酶的定位影响较小。使用凝集素染色精确分析细胞表面的糖型后,发现DOPEY1和DOPEY2的缺失可能影响末端唾液酸的合成。共聚焦荧光显微镜显示唾液酸转移酶仍然主要定于高尔基体,但是通过对高尔基体标记蛋白Golgin-97和Giantin的分析表明,高尔基体的结构呈碎片状、远离细胞核等现象。这说明,DOPEY1和DOPEY2的缺失可能通过改变高尔基体的结构来轻微地影响糖基化,比如末端唾液酸的合成。但其具体机制需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] GEMMILL T R, TRIMBLE R B. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1426(2): 227-37.
- [2] BURDA P, AEBI M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1426(2): 239-57.
- [3] KORNFELD R, KORNFELD S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides [J]. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 631-64.
- [4] STANLEY P. Golgi glycosylation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(4): a005199.
- [5] NAKAYAMA K, NAGASU T, SHIMMA Y, et al. OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides [J]. *EMBO J*, 1992, 11(7): 2511-9.
- [6] TU L, BANFIELD D K. Localization of Golgi-resident glycosyltransferases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(1): 29-41.
- [7] DAY K J, STAEHELIN L A, GLICK B S. A three-stage model of Golgi structure and function [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 140(3): 239-49.
- [8] HARRIS S L, WATERS M G. Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport [J]. *J Cell Biol*, 1996, 132(6): 985-98.
- [9] HSU J W, CHANG L C, JANG L T, et al. The N-terminus of Vps74p is essential for the retention of glycosyltransferases in the Golgi but not for the modulation of apical polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74715.
- [10] SCHMITZ K R, LIU J, LI S, et al. Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(4): 523-34.
- [11] LIU L, DORAY B, KORNFELD S. Recycling of golgi glycosyltransferases requires direct binding to coatomer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(36): 8984-9.
- [12] BARBOSA S, PRATTE D, SCHWARZ H, et al. Oligomeric Dop1p is part of the endosomal Neo1p-Ysl2p-Arl1p membrane remodeling complex [J]. *Traffic*, 2010, 11(8): 1092-106.
- [13] GILLINGHAM A K, WHYTE J R, PANIC B, et al. Mon2, a relative of large Arf exchange factors, recruits Dop1 to the Golgi apparatus [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(4): 2273-80.
- [14] ZHAO S B, SUDA Y, NAKANISHI H, et al. Yeast Dop1 is required for glycosyltransferase retrieval from the trans-Golgi network [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(6): 1147-57.
- [15] LONGTINE M S, RD M K A, DEMARINI D J, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1998, 14(10): 953-61.
- [16] BURSTON H E, MALDONADO-BAEZ L, DAVEY M, et al. Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(6): 1097-110.
- [17] PASCON R C, MILLER B L. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* requires Dopey (DopA), a member of a novel family of leucine zipper-like proteins conserved from yeast to humans [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(6): 1250-64.
- [18] DAY K J, CASLER J C, GLICK B S. Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System [J]. *Dev Cell*, 2018, 44(1): 56-72 e4.
- [19] PAPANIKOU E, GLICK B S. Golgi compartmentation and identity [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29(74-81).
- [20] TOJIMA T, SUDA Y, ISHII M, et al. Spatiotemporal dissection of the trans-Golgi network in budding yeast [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(15):
- [21] WICKY S, SCHWARZ H, SINGER-KRUGER B. Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(17): 7402-18.
- [22] ZHOU X, GRAHAM T R. Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(39): 16586-91.
- [23] TAKAR M, WU Y, GRAHAM T R. The essential neo1 protein from budding yeast plays a role in establishing aminophospholipid asymmetry of the plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(30): 15727-39.
- [24] WU Y, TAKAR M, CUENTAS-CONDORI A A, et al. Neo1 and phosphatidylethanolamine contribute to vacuole membrane fusion in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Cell Logist*, 2016, 6(3): e1228791.
- [25] TAKADA N, NAITO T, INOUE T, et al. Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature [J]. *EMBO J*, 2018, 37(9):
- [26] TAUSSIG R, CARLSON M. Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase [J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11(6): 1943-54.
- [27] BEER K B, RIVAS-CASTILLO J, KUHN K, et al. Extracellular vesicle budding is inhibited by redundant regulators of TAT-5 flippase localization and phospholipid asymmetry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(6): E1127-36.
- [28] LEWIS M J, NICHOLS B J, PRESCIANOTTO-BASCHONG C, et al. Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(1): 23-38.
- [29] HANAMATSU H, FUJIMURA-KAMADA K, YAMAMOTO T, et al. Interaction of the phospholipid flippase Drs2p with the F-box protein Rcy1p plays an important role in early endosome to trans-Golgi network vesicle transport in yeast [J]. *J Biochem*, 2014, 155(1): 51-62.
- [30] MANE S M, MARZELLA L, BAINTON D F, et al. Purification and characterization of human lysosomal membrane glycopro-

- teins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 268(1): 360-78.
- [31] JIN Z C, KITAJIMA T, DONG W, et al. Genetic disruption of multiple alpha1,2-mannosidases generates mammalian cells producing recombinant proteins with high-mannose-type N-glycans [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(15): 5572-84.
- [32] MUECKLER M, CARUSO C, BALDWIN S A, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter [J]. *Science*, 1985, 229(4717): 941-5.
- [33] LAM S K, NG T B. Lectins: production and practical applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 45-55.
- [34] NAKAMURA-TSURUTA S, KOMINAMI J, KUNO A, et al. Evidence that *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 215-20.
- [35] LUKE M R, HOUGHTON F, PERUGINI M A, et al. The trans-Golgi network GRIP-domain proteins form alpha-helical homodimers [J]. *Biochem J*, 2005, 388(Pt 3): 835-41.
- [36] 张祥翔. 现代显微成像技术综述 [J]. *光学仪器*(ZHANG X X. Imaging technology in modern microsystems [J]. *Optical Instruments*), 2015, 37(06): 550-60.
- [37] MAHAJAN D, TIE H C, CHEN B, et al. Dopey1-Mon2 complex binds to dual-lipids and recruits kinesin-1 for membrane trafficking [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3218.
- [38] ITO Y, UEMURA T, NAKANO A. Formation and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014, 310: 221-87.
- [39] TIE H C, LUDWIG A, SANDIN S, et al. The spatial separation of processing and transport functions to the interior and periphery of the Golgi stack [J]. *Elife*, 2018, 7: e41301