

Opsin3 糖基化位点的鉴定及糖基化修饰功能

刘中静^{1,2}, 乔里², 叶朝阳², 杨文秀¹

1 贵州医科大学 临床医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004

2 贵州医科大学附属医院 临床医学研究中心, 贵州 贵阳 550004

刘中静, 乔里, 叶朝阳, 杨文秀. Opsin3 糖基化位点的鉴定及糖基化修饰功能. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1173-1182.

LIU ZJ, QIAO L, YE ZY, YANG WX. Identification of the glycosylation sites of Opsin3 and its glycosylation modification function. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1173-1182.

摘要: 为鉴定 Opsin3 (OPN3) 的糖基化位点, 通过使用衣霉素 (tunicamycin) 以及 N-糖酰胺酶 F (PNGase F) 处理发现 OPN3 存在糖基化修饰; 通过预测以及蛋白质氨基酸位点突变鉴定 OPN3 的糖基化位点; 利用 SNAP 标签蛋白构建了 SNAP-Opsin3 (SNAP-OPN3) 重组蛋白, 使用 SNAP-OPN3 重组蛋白进行糖基化修饰对 OPN3 功能影响的研究。在表达 SNAP-OPN3 重组蛋白后, 使用 SNAP-tag 的反应底物 SNAP-Surface[®] 549 以及 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®] 通过荧光共聚焦显微镜观察 OPN3 以及 OPN3 糖基化位点突变体是否能够成熟转运至细胞膜。结果表明, OPN3 的 N82 位点为 OPN3 的糖基化位点; SNAP 标签不影响 OPN3 功能的正常发挥; 使用 SNAP 反应底物可以清楚地观察到糖基化位点突变的 OPN3 不能正常转运至细胞膜。本研究首次鉴定了 OPN3 的糖基化位点, 并构建了 SNAP-OPN3 重组蛋白, 发现 SNAP 标签并不影响 OPN3 的成熟转运, 并利用 SNAP 底物验证了糖基化修饰影响 OPN3 蛋白的成熟转运。

关键词: Opsin3; 糖基化修饰; SNAP; 蛋白成熟

Identification of the glycosylation sites of Opsin3 and its glycosylation modification function

LIU Zhongjing^{1,2}, QIAO Li², YE Zhaoyang², YANG Wenxiu¹

1 Department of Pathology, School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

2 Clinical Medical Research Center, Guizhou Medical University Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China

Abstract: Opsin3 (OPN3) is a photoreceptor membrane protein with a typical seven-alpha helical transmembrane structure that belongs to the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily and is

Received: February 24, 2021; **Accepted:** April 6, 2021

Supported by: Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Foundation Project, China (gzwjkj2019-1-172)

Corresponding author: YANG Wenxiu. Tel: +86-851-86770658; E-mail: ypq1964@163.com

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzwjkj2019-1-172)

widely expressed in brain. In recent years, it has been reported that OPN3 is also highly expressed in adipose tissue, and the protein is associated with the production of skin melanin. We found that the N82 site is the glycosylation site of OPN3. SNAP-tagTM has diverse functions and can be applied to a variety of different studies. By constructing a SNAP-tagged OPN3 recombinant protein, the distribution position of SNAP-OPN3 in cells can be clearly observed by fluorescence confocal microscopy using SNAP-Surface[®] 549 and SNAP-Cell[®] OregonGreen[®], which provides a new method for studying the function of OPN3. It also shows that SNAP-tag does not affect the function of OPN3. Using the SNAP tag we found that OPN3 cannot be taken up to the cell membrane after glycosylation site mutation.

Keywords: Opsin3; glycosylation modification; SNAP; protein maturation

OPN3 是第一个被确定为在眼外表达的视蛋白, 最初因其在小鼠脑中的丰富表达而被命名为脑加压素^[1], 后来发现其在哺乳动物外周器官中广泛表达后被称为全加压素^[2]。尽管 OPN3 在 20 多年前被发现, 但它仍然是最不典型的视蛋白之一, 其表达谱和功能在许多表达它的组织中是未知的^[3]。迄今为止, OPN3 的表达或功能研究主要集中在皮肤、肺、结肠、肝脏和脂肪细胞中^[4-9]。有研究发现 OPN3 在黑色素细胞中表达, 在不需要任何光刺激条件下可负向调控黑色素的生成^[10]。同时也在其他表皮细胞中, 在蓝光刺激下, OPN3 可调节角质形成细胞分化的下游效应^[11]。在肿瘤研究领域, 有报道显示在发光二极管 (light emitting diode, LED) 的照射下, OPN3 作为光感受器促进了结直肠癌细胞的自噬, 导致了结直肠癌细胞活力的降低^[8]。同时也有研究发现部分肺腺癌组织 OPN3 表达高于正常肺组织, OPN3 高表达的患者生存率较低^[12]。在有关脂肪组织的研究中发现, OPN3 敲除 (OPN3-KO) 小鼠易发生饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗, 研究揭示了棕色脂肪细胞通过 OPN3-GPCR 信号通路可以调节能量代谢, 为开发基于饮食诱导的肥胖及其相关代谢紊乱治疗方法提供了分子研究基础^[5]。

糖基化是一种蛋白质翻译后修饰, 对于蛋

白质自身的结构、稳定性以及功能的发挥起到十分重要的作用^[13]。常见的糖基化修饰分为 N-糖基化、O-糖基化、C-甘露糖基化等, 其中 N-糖基化和 O-糖基化属于比较常见的类型^[14]。糖基化修饰会对蛋白本身的功能产生重要影响, 例如影响膜蛋白的成熟转运以及蛋白质的稳定性, 同时对细胞粘附、细胞间信号传导产生影响^[15], 目前 OPN3 的糖基化位点还没有相关文献报道。

2003 年, Keppler 等^[16]和 Pegg 等^[17]开发了一种新型的蛋白标记技术——SNAP-tag, 该技术是利用 O⁶-鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶 (human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, hAGT) 可将 O⁶-烷基鸟嘌呤的烷基转移到 hAGT 有活性的半胱氨酸残基上的原理开发的。SNAP-tag 蛋白可以与 O⁶ 修饰的苯甲基鸟嘌呤 (benzylguanine, BG) 荧光底物高特异性共价结合, 从而实现带有 SNAP-tag 靶蛋白的高效特异性荧光标记^[18-19]。BG 荧光底物可携带不同波长的荧光基团, 产生 300–800 nm 不同的波长, 并且 SNAP-tag 蛋白与 BG 底物结合特异性强, 灵敏度高, 克服了绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光光谱单一、应答缓慢、灵敏度不高的缺点。目前该技术已广泛地应用于蛋白质体内外研究、细胞成像、动物

活体成像以及体外诊断等方面。

本研究通过实验首次确定了 OPN3 的 N-糖基化位点为 OPN3 N82 位点, 使用 SNAP 标签及其反应底物证实了 N-糖基化修饰影响 OPN3 蛋白的成熟使其不能正常转运至细胞膜, 本研究进一步揭示了 OPN3 蛋白的成熟条件, 为相关疾病的治疗打下了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌株、细胞与培养基

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 克隆菌株, 由北京大学生命科学院提供, 在挑取甘油菌种培养后制备感受态细胞。pcDNA3.1 质粒载体, 氨苄霉素 (Ampicillin) 抗性, 工作浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 质粒购自 Novagen 公司; HEK293T 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与耗材

Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、DL2000 Marker、限制性内切酶 Not I 和 BamH I、T4 DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒、质粒纯化回收试剂盒等购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Ni 柱及 Superdex 75 柱购自瑞典 GE Healthcare 公司; 酵母提取物 (yeast extract)、胰蛋白胨 (tryptone)、NaCl、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、谷胱甘肽、氨苄霉素、卡拉霉素、衣霉素、N-糖酰胺酶 F、生物素、Streptavidin 等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; V5 标签抗体、His 标签抗体以及二抗购自 Cell Signaling Technology 公司; SNAP-Surface[®] 549 以及 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®]购自 New England Biolabs 公司。

1.3 质粒的构建与鉴定

在 NCBI 上查找 *opsin3* 基因 (gene ID:

23596) 获得其 cDNA 全序列为 1 209 bp, 其编码 402 aa 的 OPN3 全长蛋白, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计上游和下游引物, 使用厦门大学韩家淮教授实验室赠送的 cDNA 材料进行 PCR 扩增得到 OPN3 的全长片段, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物, PCR 产物与 pcDNA3.1 分别经 BamH I 和 Not I 进行双酶切并纯化回收, 用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接, 次日取 10 μL 连接液转化大肠杆菌 DH5 α 克隆菌株, 转化液均匀涂布于含相应氨苄霉素抗性的 LB 固体培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 次日挑取单克隆菌斑进行阳性克隆鉴定, 阳性克隆鉴定初筛条带正确的菌斑, 接种于 4 mL 相应氨苄霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 次日提取质粒并送北京大学生命科学院测序鉴定。

1.4 蛋白免疫印迹

使用 24 孔板培养 HEK293T 细胞, 待其长至 50%–70%使用 Lipo2000 进行转染, 48 h 后裂解细胞, 将细胞裂解液与适量浓缩的 SDS 蛋白缓冲液混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 或沸水浴加热 3–5 min, 以充分变性蛋白。根据目的蛋白的大小配制合适浓度的 SDS-PAGE 凝胶, 随后蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 100–150 V 恒压电泳; 结束后选用 PVDF 膜, 将转膜槽放置于冰浴中进行转膜; 转膜结束后使用 3% BSA 溶液进行封闭; 封闭结束后使用对应标签的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 回收一抗后加入 TBST 洗涤液, 在摇床上洗涤 5–10 min, 重复 3 次; 随后进行二抗孵育, 室温 30–60 min; 二抗孵育结束后加入 TBST 洗涤液, 在摇床上洗涤 5–10 min, 重复 3 次; 最后使用超敏 ECL 发光液, 取等体积 A 液和 B 液 500 μL , 混匀后显影, 观察蛋白位置。

1.5 SNAP-tag 蛋白标签与底物的反应

使用 12 孔板在玻璃爬片上培养 HEK293T 细胞, 待其长至 50%–70%使用 Lipo2000 进行转染, 将构建好的带有 SNAP 标签的 OPN3 质

粒转染进细胞, 48 h 后进行下一步处理。将 SNAP-Surface[®] 549 以及 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®] 与细胞培养基按照 1 : 200 比例进行稀释后备用。除去 12 孔板中的细胞培养基后加入稀释后的 SNAP-Surface[®] 549 或 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®], 放进细胞培养箱静置 30 min; 随后使用 PBS 进行洗涤除去稀释后的 SNAP-Surface[®] 549 或 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®], 加入 PBS 后放进细胞培养箱静置 5 min, 重复 3 次, 以减少背景污染。PBS 洗涤后使用 DAPI 进行细胞核的染色, 最后将爬片放到载玻片上, 使用共聚焦显微镜 (DM6000CS, Leica) 进行拍摄, SNAP-Surface[®] 549 组的激发波长为 549 nm, SNAP-Cell[®] Oregon Green[®] 组的激发波长则为 488 nm。

1.6 生物素标记实验

使用六孔板培养 HEK293T 细胞, 待其长至 50%–70% 使用 Lipo2000 进行转染, 在细胞转染 48 h 后, 使用 2 mg/mL 的生物素溶液进行标记; 除去 12 孔板中的细胞培养基后加入 2 mg/mL 的生物素溶液孵育细胞 1 h; 随后裂解细胞, 取 500 μ L 裂解后的细胞清液加入 10–20 μ L 的链霉

亲和素琼脂糖珠子 (streptavidin agarose) 进行孵育, 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 或过夜孵育, 孵育后使用裂解液漂洗 streptavidin agarose, 每次 10 min, 漂洗 3 次, 随后进行蛋白免疫印迹验证。

2 结果与分析

2.1 SNAP-OPN3 重组蛋白的构建以及 OPN3 糖基化修饰的鉴定

在 NCBI 数据库上查找 OPN3 的全长序列, 设计引物后通过 PCR 得到 OPN3 的完整序列。SNAP-OPN3 重组蛋白基因的构建方案如图 1A 所示, 为防止 SNAP 蛋白影响 OPN3 蛋白的构象从而影响 OPN3 蛋白功能的行使, SNAP 蛋白与 OPN3 蛋白之间增加了由 12 个甘氨酸和丝氨酸组成的铰链区。质粒构建完成后测序序列完全正确, 无碱基突变。随后将两种质粒转染进 HEK293T 细胞中, 48 h 后裂解细胞, 经 Western blotting 验证, 两种质粒均可在哺乳动物细胞系统中正常表达 (图 1B), 表明 SNAP 蛋白并不影响 OPN3 的合成过程。随后将 OPN3 质粒转染进 HEK293T 细胞中, 24 h 后使用 2 μ g/mL 的衣霉素处理细胞, 在质粒转染 48 h

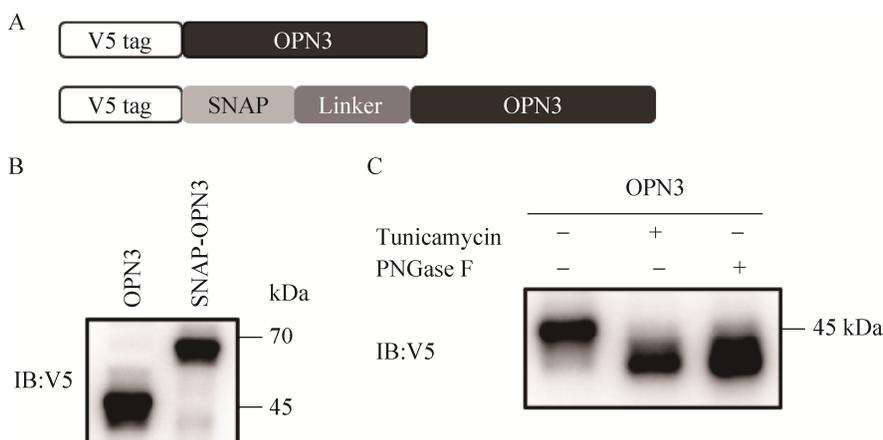


图 1 SNAP-OPN3 构建模式图以及 OPN3 糖基化修饰的鉴定

Figure 1 Schematic diagram of SNAP-OPN3 construction and identification of OPN3 glycosylation modification. (A) Schematic of OPN3 and SNAP-OPN3. (B) Band pattern of OPN3 and SNAP-OPN3. (C) Band pattern of OPN3 under the treatment of tunicamycin and PNGase F. For all WB assays, the numbers on the right of the blot represent molecular weight (kDa).

后裂解细胞。使用 PNGase F 处理 OPN3 蛋白, PNGase F 能够在体外去除蛋白的 N-糖基化修饰, 糖基化修饰可使蛋白大小发生改变, 可据此判断蛋白糖基化的有无。Western blotting 检验表明, 在衣霉素以及 PNGase F 处理后 OPN3 蛋白条带发生了明显的下降迁移过程 (图 1C), 由此猜测 OPN3 蛋白存在 N-糖基化修饰。

2.2 OPN3 糖基化位点的预测以及预测位点突变体的构建

在初步鉴定了 OPN3 存在糖基化修饰后, 使用 DTU Bioinformatics 软件预测了 OPN3 可能的糖基化位点, 可能性最高的两个位点分别是 N82 以及 N198 位点 (图 2A)。接下来通过对比人、小鼠、鸡以及斑马鱼之间的 N82 以及 N198



图 2 OPN3 糖基化位点的预测以及相应突变体的构建

Figure 2 Prediction of OPN3 glycosylation sites and construction of corresponding mutants. (A) N-glycosylation prediction of OPN3. (B) Demonstration of the two conserved asparagine in different species. (C) Band pattern of OPN3WT, OPN3 N82Q and OPN3 N198Q.

位点,发现两个位点高度保守,结果如图 2B 所示。随后使用之前 OPN3 质粒构建模式构建了 OPN3 N82Q 以及 OPN3 N198Q 两个 OPN3 的突变体。通过将 OPN3、OPN3 N82Q 以及 OPN3 N198Q 转染进 HEK293T 细胞,48 h 后裂解细胞,Western blotting 验证结果可以看到在 N82 位点突变后 OPN3 蛋白条带明显下移,而 N198 位点突变后条带位置没有变化(图 2C),由此推测 N82 位点为 OPN3 的 N-糖基化位点。

2.3 N82 位点为 OPN3 的唯一 N-糖基化修饰位点

通过以上结果推测 N82 位点为 OPN3 的糖基化修饰位点,但蛋白质有可能多个位点均可发生糖基化修饰,那么 N82 位点是否为 OPN3 的唯一糖基化修饰?随后将 OPN3、OPN3 N82Q 以及 OPN3 N198Q 转染进 HEK293T 细胞,同图 1C 处理方式,使用衣霉素以及 PNGase F 处理 OPN3 以及两个突变体,经过 Western blotting 验证,结果如图 3A 和 3B 所示,OPN3 N198Q 突变体在衣霉素和 PNGase F 处理后同 OPN3 一致,均有蛋白条带下移的现象,说明

OPN3 N198Q 突变体仍存在糖基化修饰,N198 位点不是 OPN3 的糖基化修饰位点。与 OPN3 N198Q 突变体不同的是,OPN3 N82Q 突变体在衣霉素和 PNGase F 处理后蛋白条带不再下移,说明 OPN3 N82Q 突变体已不存在 N-糖基化修饰,N82 位点为 OPN3 唯一的 N-糖基化修饰位点。

2.4 OPN3 糖基化修饰影响 OPN3 的成熟转运至细胞膜

蛋白质的 N-糖基化修饰对蛋白质功能的发挥起到重要作用,对于膜蛋白来说,糖基化修饰可能会影响蛋白质的成熟转运,从而影响膜蛋白功能的发挥。为了研究糖基化修饰对 OPN3 的影响,按照图 1A 构建 SNAP-OPN3 N82Q 蛋白,用于研究糖基化对 OPN3 功能的影响。同时利用生物素标记技术,在将 OPN3、OPN3 N82Q 以及 OPN3 N198Q 转染进 HEK293T 细胞后进行膜蛋白标记,生物素标记后使用 Streptavidin 树脂珠进行下拉实验,结果如图 4A 所示,OPN3 以及 OPN3 N198Q 均可通过 Streptavidin 树脂珠下拉得到,而 OPN3 N82Q 则不能,表明 OPN3 N82Q 不能正常转运至细胞

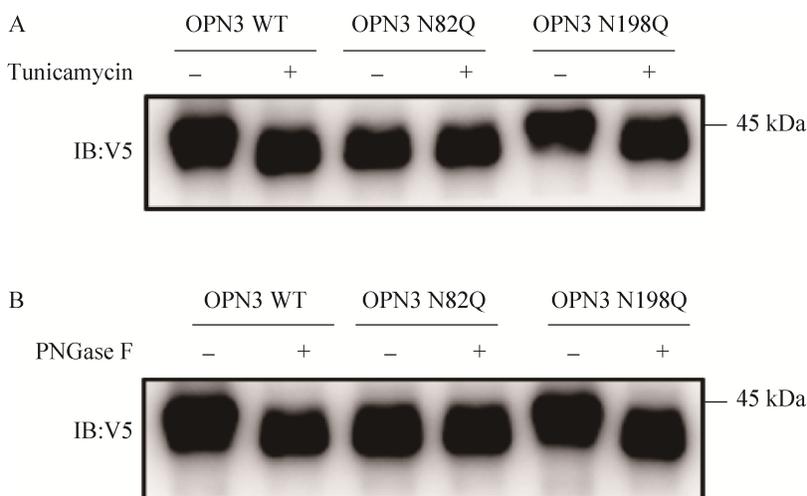


图 3 OPN3 糖基化位点的验证

Figure 3 Validation of OPN3 glycosylation sites. Band pattern of OPN3WT, OPN3 N82Q and OPN3 N198Q under the treatment of tunicamycin (A) and PNGase F (B).

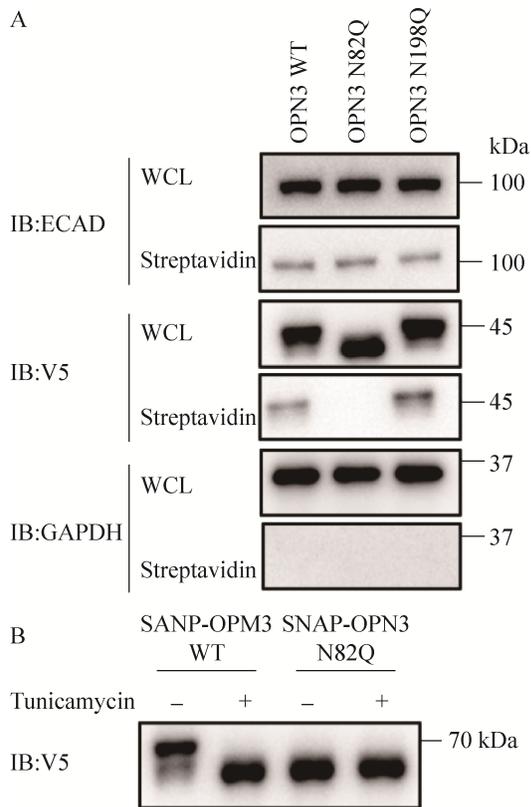


图 4 糖基化修饰影响 OPN3 成熟转运至细胞膜
 Figure 4 Glycosylation modification affects OPN3 maturation and transportation. (A) Surface biotin labeling assay of OPN3 WT, N82Q and N198Q. (B) Band pattern of SNAP-OPN3 WT and SNAP-OPN3 N82Q under the treatment of tunicamycin. WCL represents whole cell lysate.

膜, 结果表明糖基化可影响 OPN3 转运至细胞膜发挥功能。随后通过构建 SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q, 通过使用衣霉素处理后发现 SNAP-OPN3 仍存在糖基化修饰, 而 SNAP-OPN3 N82Q 则不存在 (图 4B), 表明 SNAP 标签不影响 OPN3 的糖基化修饰。

随后将 SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q 转入 HEK293T 细胞, 48 h 后使用不能够入膜的 SNAP 标签底物 SNAP-Surface[®] 549 孵育细胞 30 min, 随后使用共聚焦显微镜进行观察, 图 5A 可以看到细胞膜上红色荧光的存在, 表明 OPN3 可正常转运至细胞膜上发挥作用,

但是 SNAP-OPN3 N82Q 突变体则没有红色荧光显示, 表明 OPN3 N82Q 突变体不能够被转运至细胞膜。同时使用能够入膜的 SNAP 标签底物 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®], 图 5B 可以看到 SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q 均在细胞内表达, 从此实验结果也可知 OPN3 N82Q 突变体可在细胞内正常表达但不能被转运至细胞膜。由此实验结果可以确定 OPN3 的 N-糖基化修饰会影响 OPN3 蛋白的成熟转运, 在 OPN3 糖基化修饰缺失后, OPN3 蛋白将不能正常转运至细胞膜发挥功能。

3 讨论

OPN3 是近年来第一个被确定为在眼外表达的视蛋白, 并且多项研究报道显示 OPN3 与肿瘤以及脂肪细胞的能量代谢密切相关。作为跨膜蛋白, OPN3 的翻译后修饰以及结构研究甚少。据研究显示, 人源的蛋白质 50% 以上都被糖基化, 糖基化修饰在蛋白质成熟以及蛋白质发挥功能的过程中都起着非常重要的作用。首先本研究通过常用的衣霉素以及 PNGase F 处理 OPN3 蛋白, 发现 OPN3 蛋白存在糖基化修饰。随后通过糖基化位点的预测, 选取了两个可能性最大的 N-糖基化位点, 分别是 N82 以及 N198 位点。通过点突变, 将 N82 以及 N198 位点突变成了 Q82 以及 Q198, 使用衣霉素以及 PNGase F 处理 OPN3 N82Q 以及 OPN3 N198Q 突变体, 结果显示在 N82 位点突变后 OPN3 的糖基化修饰消失, 故本研究首次成功鉴定了 OPN3 的 N-糖基化位点——N82 位点。

为进一步研究糖基化修饰对 OPN3 的影响, 随后使用生物素标记膜蛋白, 在生物素与膜蛋白相互作用后使用 Streptavidin 树脂珠进行下拉。通过生物素标记实验发现, OPN3 以及 OPN3 N198Q 突变体均可正常成熟转运至细胞

膜, 可被生物素标记从而被下拉至 Streptavidin 树脂珠, 而 OPN3 N82Q 突变体则不能被转运至细胞膜。故得出结论, 糖基化修饰影响 OPN3 的成熟转运至细胞膜, 在糖基化修饰消失后, OPN3 则不能正常成熟转运至细胞膜行使功能。

为进一步证实糖基化修饰影响 OPN3 成熟转运至细胞膜, 本研究使用了 SNAP 标签蛋白, 构建了 SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q 蛋白。首先通过衣霉素以及 PNGase F 处理

SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q 蛋白, 结果显示 SNAP 标签蛋白并不影响 OPN3 的糖基化修饰, 在 N82 位点突变后, SNAP-OPN3 N82Q 蛋白仍不存在糖基化修饰。随后使用 SNAP 反应底物, 分别是不能透过细胞膜的 SNAP-Surface[®] 549 以及可以透过细胞膜的 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®], 荧光成像结果表明 SNAP-OPN3 以及 SNAP-OPN3 N82Q 均可以在细胞中正常表达, 但 SNAP-OPN3 也存在于细

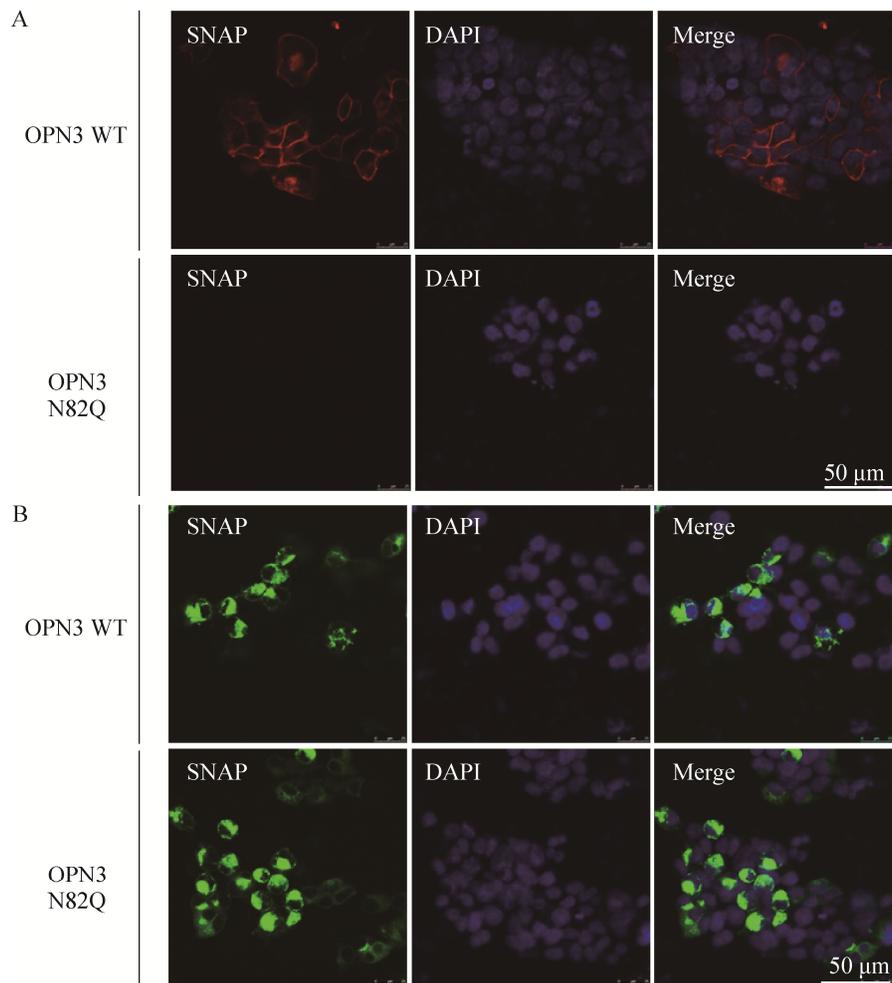


图 5 糖基化修饰影响 OPN3 成熟转运至细胞膜

Figure 5 Glycosylation modification affects OPN3 maturation and transportation. (A) Confocal fluorescent imaging of SNAP-tagged OPN3 and OPN3 N82Q on the plasma membrane. SNAP-tagged proteins are labelled with cell-impermeable SNAP-Surface[®] 549. DAPI labels the nucleus. (B) Confocal fluorescent imaging of SNAP-tagged OPN3 and OPN3 N82Q. SNAP-tagged proteins are labelled with cell-permeable SNAP-Cell[®] Oregon Green[®]. DAPI labels the nucleus.

胞膜,而在 N82 位点突变后,SNAP-OPN3 N82Q 不能在细胞膜上观察到,表明该 OPN3 不能够成熟转移至细胞膜。以上实验结果均证实糖基化修饰影响 OPN3 成熟转运至细胞膜。

同时从使用 SNAP-Cell[®] Oregon Green[®] 的荧光成像结果来看, SNAP-OPN3 N82Q 与 SNAP-OPN3 相比存在明显的在细胞内团聚的现象。从该实验结果推测,可能是由于 SNAP-OPN3 N82Q 缺少糖基化修饰,不能正确地在内质网折叠,从而不能进一步转运至高尔基体进行再加工,影响了 OPN3 的成熟转运至细胞膜,从而影响 OPN3 功能发挥。根据文献报道,OPN3 可促进肺腺癌的发展,在 OPN3 过表达的情况下肺腺癌细胞系增殖能力增强,生长速度加快^[12]。本研究鉴定了 OPN3 的糖基化位点,并发现糖基化修饰影响 OPN3 成熟转运至细胞膜,从而影响 OPN3 功能的发挥,后续实验可进一步探究糖基化修饰是否可通过影响 OPN3 进而影响相关的肺腺癌的生长,为 OPN3 过表达的肺腺癌提供新的治疗思路。

OPN3 作为跨膜蛋白,其蛋白质结构还未成功解析,对于 OPN3 蛋白质的合成过程以及翻译后修饰研究也较少,本研究首次鉴定了 OPN3 的糖基化位点,并通过生物素标记以及 SNAP 标签荧光成像等实验手段发现了 OPN3 的糖基化修饰可影响 OPN3 的成熟转运从而影响 OPN3 功能的发挥,为进一步了解 OPN3 的成熟过程提供了分子理论基础,同时也为相关的疾病治疗提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Blackshaw S, Snyder SH. Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. *J Neurosci*, 1999, 19(10): 3681-3690.
- [2] Halford S, Freedman MS, Bellingham J, et al. Characterization of a novel human opsin gene with wide tissue expression and identification of embedded and flanking genes on chromosome 1q43. *Genomics*, 2001, 72(2): 203-208.
- [3] Olinski LE, Lin EM, Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. *Adv Biol Regul*, 2020, 75: 100668.
- [4] Jiao J, Hong S, Zhang J, et al. Opsin3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil treatment by regulating the apoptotic pathway. *Cancer Lett*, 2012, 320(1): 96-103.
- [5] Sato M, Tsuji T, Yang K, et al. Cell-autonomous light sensitivity via Opsin3 regulates fuel utilization in brown adipocytes. *PLoS Biol*, 2020, 18(2): e3000630.
- [6] White JH, Chiano M, Wigglesworth M, et al. Identification of a novel asthma susceptibility gene on chromosome 1qter and its functional evaluation. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(13): 1890-1903.
- [7] Yim PD, Gallos G, Perez-Zoghbi JF, et al. Airway smooth muscle photorelaxation via opsin receptor activation. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(1): L82-L93.
- [8] Yoshimoto T, Morine Y, Takasu C, et al. Blue light-emitting diodes induce autophagy in colon cancer cells by Opsin 3. *Ann Gastroenterol Surg*, 2018, 2(2): 154-161.
- [9] Barreto Ortiz S, Hori D, Nomura Y, et al. Opsin 3 and 4 mediate light-induced pulmonary vasorelaxation that is potentiated by G protein-coupled receptor kinase 2 inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(1): L93-L106.
- [10] Regazzetti C, Sormani L, Debayle D, et al. Melanocytes sense blue light and regulate pigmentation through opsin-3. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(1): 171-178.
- [11] Rios MN, Marchese NA, Guido ME. Expression of non-visual opsins Opn3 and Opn5 in the developing inner retinal cells of birds. light-responses in Müller glial cells. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 376.
- [12] Xu C, Wang RX, Yang YF, et al. Expression of OPN3 in lung adenocarcinoma promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *Thorac Cancer*, 2020, 11(2): 286-294.

-
- [13] Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB Rep*, 2011, 44(12): 772-781.
- [14] 王晓龙, 王秀然, 卢天成. 蛋白质糖基化修饰的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10): 4380-4384.
Wang XL, Wang XR, Lu TC. The research progress of protein glycosylation modification. *Genom Appl Biol*, 2017, 36(10): 4380-4384 (in Chinese).
- [15] 石玉梅, 郑磊, 李娟. 糖基化对蛋白质稳定性的影响研究进展. *现代生物医学进展*, 2011, 11(S2): 5190-5192.
Shi YM, Zheng L, Li J. Research progress of glycosylation on protein stability. *Prog Mod Biomed*, 2011, 11(S2): 5190-5192 (in Chinese).
- [16] Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, et al. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 86-89.
- [17] Pegg AE, Byers TL. Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *FASEB J*, 1992, 6(6): 2302-2310.
- [18] Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, et al. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J*, 2000, 19(7): 1719-1730.
- [19] Pegg AE. Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res Mutat Res*, 2000, 462(2/3): 83-100.

(本文责编 郝丽芳)