

ALG11-CDG 突变蛋白在原核细胞中的稳定表达

王 佩, 李盛陶, 王 宁, 高晓冬*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 甘露糖基转移酶 Alg11 是 N 糖基化途径中的关键酶, 催化第 4 和第 5 个甘露糖(Man)残基以 α -1,2 连键的形式转移到底物 Man3-GlcNAc2-PP-Dol 生成 Man5-GlcNAc2-PP-Dol, 人类 ALG11 基因致病突变会导致相关的先天性糖基化疾病 ALG11-CDG (Congenital Disorders of Glycosylation)。目前, 对 ALG11-CDG 的研究更侧重于其临床症状, 而患者 Alg11 突变蛋白的性质还有待探索。作者以研究 ALG11-CDG 突变蛋白的重组表达及活性为目的, 首先在人胚胎肾细胞 HEK293 和酿酒酵母中分别表达了 Alg11 野生型及突变体蛋白, 发现其表达量存在显著差异, 突变体蛋白不能稳定表达。最终在大肠杆菌中成功稳定表达了野生型及 ALG11-CDG 相关突变蛋白, 利用液质联用定量分析了蛋白质的活性, 结果显示, 突变蛋白的活性存在不同程度的降低, 其降低程度与 ALG11-CDG 疾病的严重程度存在一定的相关性。上述研究结果证明: 1) ALG11-CDG 相关突变蛋白的不稳定有可能是造成疾病的原因之一; 2) 体外定量测试大肠杆菌表达的 ALG11-CDG 相关突变蛋白的活性可以为相应患者的疾病严重程度提供参考。

关键词: N-糖基化; 糖基转移酶 Alg11; ALG11-CDG; 酶活

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2021)02-0065-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.009

Stable Expression of ALG11-CDG Mutant Proteins in Prokaryotic Cells

WANG Pei, LI Shengtao, WANG Ning, GAO Xiaodong*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: As a key enzyme in the N-glycosylation pathway, mannosyltransferase Alg11 catalyzes the addition of 4th and 5th mannose residues to the substrate Man3-GlcNAc2-PP-Dol with the α -1,2 linkage, resulting Man5-GlcNAc2-PP-Dol. The mutations in human *ALG11* gene will lead to the corresponding congenital disorders of glycosylation (CDG), namely ALG11-CDG. Currently, more attention was paid to the clinical symptoms in the study of ALG11-CDG, rather than the properties and functions of the mutant Alg11 proteins. This study aimed to investigate the expression of ALG11-CDG mutant proteins and test the activity. Firstly, the wild-type and mutant Alg11 proteins were expressed in human embryonic kidney cells (HEK293) and *Saccharomyces cerevisiae*. While in both expression systems, the mutant proteins showed great differences in expression level, indicating unstable expression. Alg11 and Alg11 mutated proteins were finally stably and successfully expressed

收稿日期: 2020-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(21778023, 21807048); 江苏省自然科学基金项目(BK20170174); 中央高校自主科研计划项目(JUSRP11727); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事细胞分子生物学、糖生物学等方面的研究。

E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

in *E.coli*, and the activity of mutated proteins was quantitatively analyzed by liquid and mass chromatography. The results showed that the activity of Alg11 and ALG11-CDG mutated proteins decreased to different degrees, which was correlated with the severity of ALG11-CDG disease. The results indicate that: 1) the instability of mutant proteins may cause ALG11-CDG, 2) the in vitro quantitative assay of the mutant proteins expressed in *E.coli* may provide an alternative method to analyze the severity of ALG11-CDG.

Keywords: N-glycosylation, glycosyltransferase Alg11, ALG11-CDG, enzyme activity

在真核生物中,天冬酰胺(N)连接的糖基化直接影响糖蛋白的结构和生物学功能,是最重要的翻译后修饰过程之一^[1-2]。N-聚糖合成是一个高度保守的多步骤反应过程,首先在内质网膜上组装合成一个多萜醇连接的寡糖前体 Glc3Man9GlcNAc2-PPDol(DLO)^[3]。13个称为 Alg 蛋白(天冬酰胺连接的糖基化)的 ER 糖基转移酶,催化 DLO 的生物合成^[4]。然后在内质网腔内,寡糖基转移酶(OST)的作用下将寡糖部分从多萜醇锚定物上转移到新合成蛋白质的天冬酰胺残基上。之后,寡糖连接的糖蛋白经历晚期 ER 和高尔基体的进一步修饰,包括选择性去除甘露糖残基并添加 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖、唾液酸和岩藻糖残基,随后成熟的寡糖连接的糖蛋白运输到细胞表面或分泌到细胞外^[5]。

N-聚糖的合成以及糖蛋白和糖脂的附着装配中的遗传缺陷属于先天性糖基化疾病(CDG)大家族^[6]。目前已经有超过 150 种 CDG 类型被报道,其中大多数涉及 N-糖基化的缺陷^[7-8]。与 CDG 相关的疾病异常现象几乎影响每个器官系统^[9]。大多数 CDG 表现为常染色体隐性遗传,并具有以下特征的广泛的多系统缺陷,包括神经系统缺陷、发育迟缓、多器官肌张力低下、消化系统异常、腺体功能异常及凝血障碍等^[9-11]。

ALG11 位于 13 号染色体上并编码甘露糖基转移酶,在内质网外侧以 GDP-Man 为底物,将第 4 和第 5 个 Man 转移到 DLO 上^[12]。ALG11-CDG 源于 ALG11 基因的致病突变。迄今为止,仅 12 位患者被确诊为 ALG11-CDG^[13-17],见表 1。ALG11-CDG 病人虽然都呈现广泛的多系统缺陷,但是不同患者的疾病严重程度并不一样,尤其是存活时间;有些病人很早就死亡;有些病人能存活很多年。目前对应不同 ALG11-CDG 突变的患者疾病严重程度的测定方

法主要是通过酵母回补实验,即将 CDG 相关的人 Alg11 突变蛋白转入敲除 ALG11 基因导致的温度敏感酵母中,观察酵母生长缺陷及低糖基化的回补情况^[10]。但是此方法结果显示,酵母生长缺陷的严重程度与病人的严重程度没有很好的相关性,因此需要有一种定量的方法来揭示存在于 Alg11 中的不同突变与疾病严重程度的相关性。

表 1 ALG11-CDG 病例总结

Table 1 Summary of ALG11-CDG patients

病人	年龄	突变
Rind et al. (2010) (pt A)	2 岁死亡	同合子突变 257 T > C, p.L86S
Rind et al. (2010) (pt B)	NA	同合子突变 257 T > C, p.L86S
Thiel et al. (2012) (pt A)	目前 7 岁	杂合子突变 623_624del; c.836A > C, p.Y279S
Thiel et al. (2012) (pt B)	目前 4.5 岁	杂合子突变 1142 T > C, P. L381S; c.1192G > A, p.E398K
Thiel et al. (2012) (pt C)	目前 8.5 岁	同合子突变 953A > C, p.Q318P
Regal et al. (2015) (pt A)	3 岁死亡	杂合子突变 479G > T, p.G160V; c.-2A > T
Regal et al. (2015) (pt B)	4 个月死亡	杂合子突变 479G > T, p.G160V; c.36dupG
Al Teneiji et al. (2017)	目前 7 岁	同合子突变 1241 T > A, p. I414N
Al Teneiji et al. (2017)	目前 4 岁	杂合子突变 1123_1126delAACA, p. N375FfsX6; c.986_988delAGA, p.K329del
Pereira et al. (2017)	目前 4 岁	NA
Haanpää et al. (2018)(ptA)	目前 26 个月	杂合子突变 935A > G, p. E312G; c.1223 T > G, p.M408R
Haanpää et al. (2018)(ptB)	目前 14 岁	杂合子突变 127 T > C p.L46P; whole gene deletion

NA:数据不能获得

Alg11 的底物 DPGn2M3 从动植物组织中提取效率低,且 DPGn2M3 结构中多萜醇(Dolichol)的碳链较长,导致其合成和纯化难度很高。具有与多萜醇类似结构而碳链较短的植烷醇(Phytanol)成为体外合成 Alg1/Alg2/Alg11 复合体底物 DPGn2 中脂肪链部分的首选。近年来开发出的通过化学法将植烷醇与壳二糖偶联合成出 PPGn2 的方法,为研究 N-糖基转移酶性质开辟了新途径^[18-19]。作者所在实验室前期在大肠杆菌中表达了酵母来源的重组蛋白 Alg1ΔTM、Trx-Alg2 和 Alg11ΔTM,以 PPGn2 为底物,GDP-Man 为糖基供体,利用化学酶法快速高效的合成 PPGn2M5,该底物合成对体外测定人 Alg11 突变蛋白活性提供了重要的依据^[20-23]。

作者尝试在 HEK293 和酿酒酵母及大肠杆菌中表达人 ALG11-CDG 相关突变蛋白,并成功在大肠杆菌中大量表达。结合本实验室开发的体外重构 N-糖基化途径中多萜醇寡糖前体的方法,测定了 ALG11-ODG 相对活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌表达菌株 Rosetta DE3 和表达载体 pET-28a 质粒:购于德国 Novagen 公司;人基因组文库:购于美国 Invitrogen 公司;质粒 pRS426、pME-hyg:酿酒酵母 W303a、人体胚胎肾细胞 HEK293;均为作者所在实验室保存,见表 2;引物合成及基因测序:由华大基因公司完成。

1.1.2 培养基 大肠杆菌 XL10-Gold 使用 LB 液体或固体培养基培养;大肠杆菌表达菌株使用 TB 培养基培养;酿酒酵母使用 YPAD 和 SD-Ura 培养;人胚胎肾细胞 HEK293 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)中培养。

表 2 本研究所用表达系统和 ALG11-CDG 突变位点
Table 2 Expression system and ALG11-CDG mutation sites used in this study

表达系统	突变位点
HEK293	p.L86S, p.G160V, c.623-642del,
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.Y279S,p.Q318P,
<i>E. coli</i>	p.L381S, p.E398K

1.1.3 主要试剂 Primer Star GLX DNA 聚合酶、Ligation Mix DNA 连接酶、2× Taq Master Mix 及限制性内切酶:购自大连宝生物工程公司;SDS-PAGE

蛋白质凝胶制备试剂盒:购自碧云天生物;Clarity™ Western ECL Substrate 显色剂:购自伯乐中国公司;Goat Anti-Mouse IgG HRP、Blue Plus II Protein Marker、1 kb Plus DNA Ladder:购自北京全式金生物公司;Anti-Flag Mouse mAb、GDP-Man:购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;SanPrep 胶回收试剂盒、SanPrep 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小型抽提试剂盒:购自生工生物工程公司;DMEM-F12 培养基和胎牛血清(FBS):购自 Gibco 公司;其他试剂:均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.4 主要仪器 半干电转仪:购自伯乐中国公司;三重四极杆液质连用仪:购自美国赛默飞世尔科技公司;液相色谱柱粒径 1.7 μm,2.1 mm×100 mm:购自美国沃特世公司;Image Quant™ LAS 4000 mini 显像仪:购自美国通用电气公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 在 NCBI 数据库中下载人类 ALG11 的基因序列。引入酶切位点 *Xho* I 和 *Kpn* I,所有 ALG11 点突变引物根据 Agilent 公司 QuikChange Primer Design 在线设计。以 ALG11-Fw 和 ALG11-Rv(见表 3)为引物,以人基因组文库中包含 *ALG11* 基因的单克隆质粒为模板扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 PCR 产物回收试剂盒回收目的片段,经 *Xho* I 与 *Kpn* I 双酶切,载体用相同的体系进行双酶切,回收后的片段与载体用 ligation mix 连接,转化 XL10-Gold 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基皿上(含 100 μg/mL 的 Amp),37 °C 培养过夜,挑取单菌落进行菌落 PCR 及双酶切电泳图谱鉴定,并测序验证。

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')
ALG11-Fw	GGTACCATGCCGCCGCCGAAAGGAGC
ALG11-Rv	CTCGAGTTACTTAAATAACTTTTCCAC

1.2.2 蛋白质印记法 取制备的蛋白质溶液 40 μL,加入 10 μL 5×SDS 蛋白质上样缓冲液,混匀后于 100 °C 煮 10 min。配制 12 g/dL 的分离胶和 5 g/dL 的浓缩胶。取 5 μL 蛋白质样品上样,电压 90 V、30 min,后转为 180 V、1 h。半干法转膜后,5% 脱脂牛奶封闭 1 h;一抗 Anti-Flag Mouse mAb(1:3 000),室温孵育 2 h;二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP

(1:5 000), 室温孵育 1 h; 用 Clarity™ Western ECL Substrate 显色液显色, Image Quant™ LAS 4000mini 显像系统对结果进行分析。

1.2.3 重组蛋白在人体胚胎肾细胞中表达 首先将细胞接种到 6 孔板中, 待细胞长到 90% 时, 参照 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 的说明书, 转染前吸去细胞原有培养基, 加入 2 mL 新鲜的完全培养基, 转染时取 2 个 EP 管, A 管将 4 μ g pME-ALG11-3Flag 野生型及突变体质粒溶于 250 μ L Opti-MEM 无血清培养基中。B 管将 5 μ L lipo2000 溶于 250 μ L Opti-MEM 无血清培养基中, 混匀室温放置 5 min。将 A B 两管混合, 放置 20 min, 向培养皿加入 EP 管中混好的脂质体, 12 h 后换新鲜培养基, 24 h 后用胰酶消化保留一半的细胞, 48 h 后收集细胞, 用 1 mL PBS 洗一遍。向其中加入 60 μ L 裂解液 (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 1.5 mmol/L EDTA, 1% 曲拉通, 1 mmol/L PMSF), 混匀, 在冰上静置 30 min 后于 15 000 r/min 离心 15 min, 参照 1.2.2 中的方法检测蛋白质表达。

1.2.4 放线菌酮 (Cycloheximide) 追踪实验 转染 24 h 后用潮霉素 (hygromycin, Invitrogen, USA) 筛选 2 周, 并用有限稀释法 (limiting dilution cloning, LDC) 分离单克隆细胞株, 由此获得 HEK 293 稳定表达 Alg11 及突变蛋白的细胞株。将 100 μ g/mL 放线菌酮 (Cycloheximide) 添加到生长状态良好的细胞中, 并分装细胞在添加后的指定时间去除。收集细胞, 参照 1.2.2 中的方法检测蛋白质表达。

1.2.5 重组蛋白质在酿酒酵母中表达 接种 W303a 到 5 mL YPAD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 摇床过夜振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0 左右, 收集菌体, 加入 100 μ L 一步转化液 (1 mol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 10 μ L, 2 mol/L 醋酸锂 (LiAc) 10 μ L, 50% 聚乙二醇 80 μ L) 及 0.5~1 μ g 带有 URA3 遗传标记的一系列 pRS316-TEFpr-ALG11-3Flag 野生型及突变体质粒 DNA 并振荡混匀, 将混合液置于金属浴加热器中, 45 $^{\circ}$ C 反应 30 min; 反应结束后, 涂布于 SD-Ura 平板, 待单菌落生长到合适大小后, 挑取若干单菌落划线于 SD-Ura 平板上, 2~3 d 后挑取适量酵母菌接种到 SD-Ura 液体培养基中, 收集对数生长期的 OD 为 5 左右的酿酒酵母菌体, 加入 200 μ L 8 mol/L 尿素, 并加入和菌体等体积的玻璃珠 (425~600 nm,

Sigma-Aldrich), 涡旋振荡 1 min, 冰上放置 1 min, 15 个循环裂解酿酒酵母, 释放细胞内蛋白质。酿酒酵母裂解后于 4 $^{\circ}$ C 下 15 000 r/min 高速离心 15 min, 收集上清液, 蛋白质质量浓度用 BCA 试剂盒测定, 参照 1.2.1 中的方法检测蛋白质表达。

1.2.6 重组蛋白在大肠杆菌中表达 将 pET28a-ALG11 质粒转化到 Rosetta DE3 大肠杆菌中得到重组菌。挑取单菌落接种到 5 mL LB 培养基 (含 50 μ g/mL Kan, 34 μ g/mL Cm) 中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养 (约 12 h)。按照体积分数 1% 接种于新鲜 TB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 时, 将摇瓶移至 16 $^{\circ}$ C 摇床, 取 1 mL 菌液作诱导前对照, 待培养基温度降低后添加 100 mmol/L IPTG, 16 $^{\circ}$ C 培养 16 h。诱导后取 1 mL 菌液作诱导后对照, 9 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集菌体。收集 10 mL 菌体重悬缓冲液 (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 将菌体冰浴超声破碎 (超声 2 s, 停 2 s, 持续 2 min) 后于 4 $^{\circ}$ C、4 000 g 离心 30 min, 弃沉淀, 收集上清液。100 000 g 超速离心 60 min, 弃上清液, 沉淀重悬于 100 μ L 缓冲液 (14 mmol/L MES/NaOH, pH 6.0, 30% 甘油), 即得到大肠杆菌细胞膜成份。膜成份中总蛋白质质量浓度用 BCA 蛋白质质量浓度测量试剂盒进行测定。取 10 μ g 上述制备的含膜成份的蛋白质, 参照 1.2.1 中的方法检测蛋白质表达。

1.2.7 LC-MS (液质联用) 定量研究 ALG11-CDG 相关突变的活性 Alg11 重组蛋白的活性测量体系标准的反应条件如下: 底物受体 PPGn2-Man3 (50 μ mol/L)、糖基供体 GDP-Man (2 mmol/L) 和含有人 Alg11 重组蛋白的大肠杆菌膜成份 (20 mg/mL) 于缓冲液 (14 mmol/L MES/NaOH, pH 6.0, 1 mol/L 蔗糖, 4 mmol/L 柠檬酸钾, 0.05% NP-40, 10 mmol/L MgCl₂) 中, 反应体积 60 μ L, 反应在 30 $^{\circ}$ C 下静止孵育 8 h 或 12 h 后, 加入 0.2 mL 浓度为 20 mmol/L 的 HCl 终止反应, 并于 100 $^{\circ}$ C 下酸解 1 h, 释放糖链与脂肪链 (Phytanol)。酸解产物加入 1 mL 体积分数 2% 的乙腈溶液混匀后, 12 000 g 离心 1 min, 上清液通过 1 mL 固相萃取填料 Supelclean ENVI-Carb Slurry 进行糖链的纯化, 纯化方法参照说明书。经过填料纯化的糖链于 25% 的乙腈溶液中洗脱, 通过冷冻干燥, 最终得到的纯化糖链粉末溶解于 40 μ L 的纯水中, 糖链用液质联用方法进行检测, 液相条件

为: 流动相 A 乙腈, 流动相 B 纯水; 梯度: 0~2 min, 20% B; 2~15 min, 20%~50% B; 15~18 min, 50% B; 流量: 0.2 mL/min, 柱温 40 ℃。质谱条件为: 正离子模式, 检测范围 m/z 400~1 600。

2 结果与讨论

2.1 ALG11-CDG 突变蛋白在 HEK293 中稳定性研究

首先在同为哺乳动物细胞的 HEK293 中表达 ALG11-CDG 相关突变蛋白。用抗 Flag-tag 抗体对蛋白质进行 Western blot 验证, 从蛋白质电泳图中可知, 在 50 000~70 000 之间出现一条明显的蛋白质条带, 目的蛋白质的理论相对分子质量为 55 600, 相对分子质量和预期的大小一致, 表明蛋白质在 HEK293 中成功表达, 见图 1。由于 Flag 标签加在蛋白质 C 端, c.623-642del 突变产生的 210 个氨基酸的截短蛋白在此处没有检测到。ALG11-CDG 相关突变蛋白比 Alg11 野生型蛋白表达量显著减少, 不同 ALG11-CDG 突变蛋白表达量也各不相同。这说明 ALG11-CDG 突变蛋白在 HEK293 中是不稳定的。

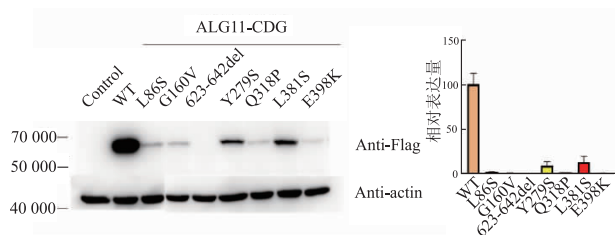


图 1 ALG11-CDG 相关突变蛋白在 HEK293 中的表达及定量分析

Fig. 1 Expression and quantitative analysis of ALG11-CDG mutant proteins in HEK293

为了研究是否确实存在 ALG11-CDG 蛋白被降解, 首先通过 CHX 追踪, 分析在 HEK293 细胞中过表达的具有 C 末端 Flag 标签的 Alg11 野生型及 ALG11-CDG L86S 突变蛋白的稳定性。L86S 蛋白半衰期约为 1 h (图 2(a)), 而 Alg11 野生型蛋白的半衰期则长达 8 h (图 2(b))。这说明哺乳动物细胞内可能存在某种机制, 如内质网相关降解途径 (ERAD), 能够准确识别降解 ALG11-CDG 蛋白, 使哺乳动物细胞 HEK293 中不能稳定表达相应蛋白质。

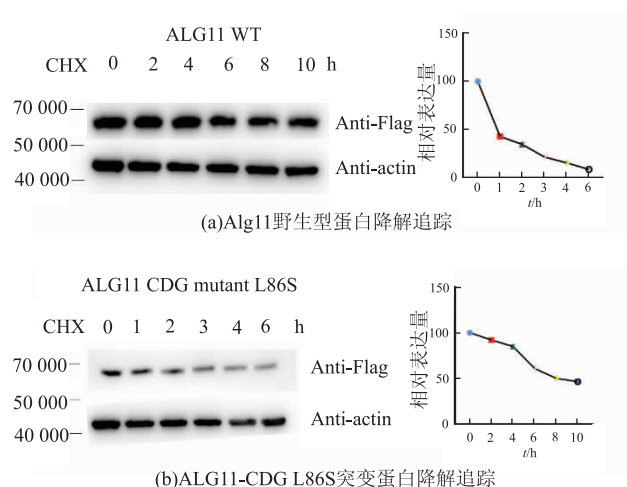


图 2 Alg11 蛋白降解追踪

Fig. 2 Degradation curve of Alg11 protein

2.2 ALG11-CDG 突变蛋白在酿酒酵母中稳定性研究

ALG11-CDG 突变蛋白在哺乳动物细胞中不稳定, 我们研究了其在另一真核生物酿酒酵母中的稳定性。Western Blot 结果表明, Alg11 及 ALG11-CDG 突变蛋白在酿酒酵母中成功表达, 见图 3。野生型 Alg11 表达量高于 6 个突变, 不同突变蛋白表达量也各不相同。这个结果说明, 酿酒酵母存在哺乳动物细胞类似的降解 ALG11-CDG 蛋白的机制, 但是和哺乳动物细胞中并不完全相同, 因此 ALG11-CDG 突变蛋白在酿酒酵母中不能稳定表达。酵母中 ERAD 跟哺乳动物细胞中的不相同, 所以我们看到 ALG11-CDG 突变蛋白在这两种细胞内的降解也不相同。

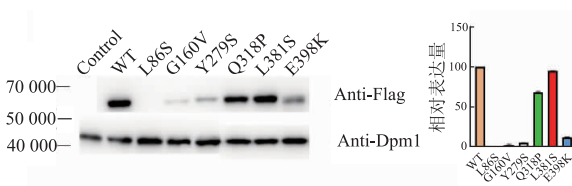


图 3 ALG11-CDG 相关突变蛋白在酿酒酵母中的表达及定量分析

Fig. 3 Expression and quantitative analysis of ALG11-CDG mutant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*

2.3 大肠杆菌中 ALG11-CDG 相关突变蛋白稳定表达

原核细胞没有真核细胞内质网相关降解途径, 因此在原核细胞大肠杆菌中表达 ALG11-CDG 相关

突变蛋白。蛋白质电泳结果表明,ALG11-CDG 相关突变蛋白在大肠杆菌中成功表达。其中 6 个突变的表达量和野生型基本一致,见图 4。c.623-642del 突变的上样量只有其它突变的 1/10,因此该突变跟其它的突变相比表达量极高,这说明 ALG11-CDG 相关突变蛋白成功在大肠杆菌中稳定表达。

2.4 LC-MS 定量分析 ALG11-CDG 相关突变的活性

大肠杆菌中稳定表达的突变和野生型蛋白可进行定量活性比较。测量它们的活性时,加入反应的总蛋白质量一致。反应 12 h 后,通过 LC-MS 进行检测,结果见图 5。c.623-642del 和 E398K 完全没有活性;L86S 活性显著降低(UPLC 图很难看到明显的产物峰,但 ESI-MS 显示在 13.7 min 和 14.7 min 附近分别有中间产物和终产物的相对分子质量产物;G160V 活性也很低;Q318P 活性降低一般;Y279S

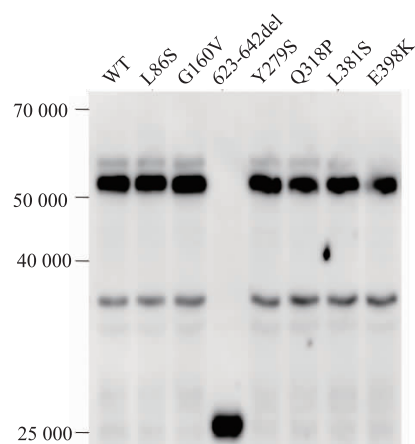


图 4 ALG11-CDG 相关突变蛋白在大肠杆菌中的表达
Fig. 4 Expression of ALG11-CDG mutant proteins in *E.coli*

和 L381S 活性相对于野生型降低很少。

双功能酶 Alg11 催化的是两个相同糖苷键的

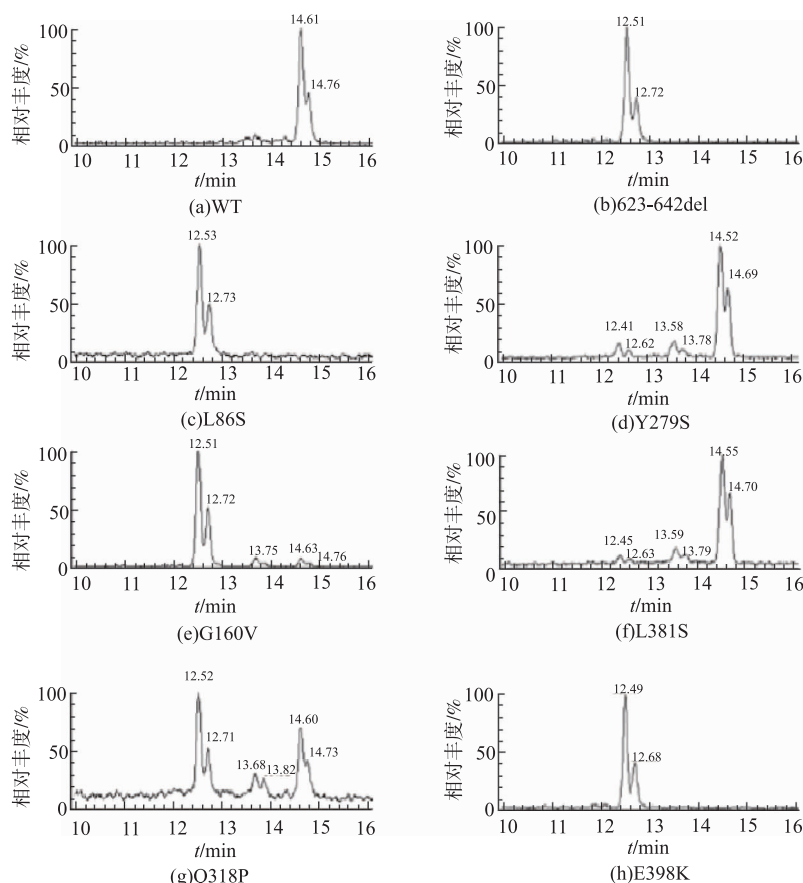


图 5 LC-MS 定量分析 ALG11-CDG 相关突变的活性

Fig. 5 Quantitative analysis of the activity of ALG11-CDG mutations using LC-MS

Man (α -1,2), 因此推测两步反应的 K_m 值差别不大,从而反应中很少有中间产物的积累,实验可以通过终产物的转化率来定量 Alg11 的活性。定义 ALG11-CDG 相关的突变蛋白的相对活性为: 突变 Alg11 的转化率/野生型 Alg11 的转化率。表 4 为定量分析 7 个突变蛋白的相对活性;病人 1(同合子突变 L86S)在 2 岁时死亡,L86S 突变蛋白只有 1.8%野生型的活性,与病人严重的症状相吻合;病人 2 为病人 1 的弟弟,后面的临床症状没有报道;病人 3(杂合子突变 c.623-642del 和 Y279S) 目前 7 岁,虽然 c.623-642del 没有活性,但是 Y279S 突变蛋白仍有 83.8%野生型的活性,与病人温和的症状相吻合;病人 4(杂合子突变 E398K 和 L381S)目前 4.5 岁,虽然 E398K 没有活性,但是 L381S 突变蛋白仍有 83.8%野生型的活性,与病人温和的症状相吻合;病人 5(同合子突变 Q318P)目前 8.5 岁,Q318P 突变蛋白仍有 38.8%野生型的活性,与病人温和的症状相吻合;病人 6(杂合子突变 c.36dupG 和 G160V)在 4 个月时死亡,c.36dupG 没有活性,且 G160V 突变蛋白只有 5.8%野生型的活性,与病人严重的症状相吻合;病人 7(杂合子突变 c.45-2A>T 和 G160V)在 3 岁时死亡,c.45-2A>T 可能没有活性,且 G160V 活性极低,定量检测活性的方法显示,ALG11-CDG 相关突变的活性下降程度与疾病的严重程度具有一定的相关性。

3 结 语

首先在哺乳动物细胞 HEK293 和低等真核细胞酿酒酵母中表达 ALG11-CDG 相关突变蛋白,发

表 4 ALG11-CDG 相关突变的相对活性总结

Table 4 Summary of relative activity of mutations in ALG11-CDG patients

病人	年龄	突变	病症	相对活性
1	2 岁死亡	同合子突变	体温不稳定	1.8%
2	目前 7 岁	杂合子突变	脑萎缩及脑白质异常	0;83.8%
3	目前 4.5 岁	杂合子突变	体温不稳定	0;85.2%
4	目前 8.5 岁	同合子突变	定向运动障碍	38.8%
5	4 个月死亡	杂合子突变	幼红细胞增强因子的突发抑制,脑萎缩	NA;5.8%

相对活性: 突变 Alg11 的转化率/野生型 Alg11 的转化率;c.36dupG;55 aa;c.45-2A>T:splice site variant。

现突变蛋白表达量低于野生型 Alg11 蛋白,不同突变蛋白表达量均有显著差异,这表明 ALG11-CDG 突变蛋白不能在真核细胞中稳定表达,考虑到 Alg11 为内质网膜蛋白,其降解有可能通过 ERAD(内质网相关降解)途径的控制。而在没有 ERAD 途径的原核细胞大肠杆菌中,Alg11 野生型及突变蛋白得到了稳定表达。这一结果有力地支持 CDG 突变蛋白通过 ERAD 途径被降解的推测。与此同时,我们的 LC-MS 定量分析 ALG11-CDG 蛋白活性的结果也证明了 ALG11-CDG 突变蛋白的相对活性与疾病的严重程度存在一定的相关性。因此,大肠杆菌表达的方法可以用于 CDG 患者疾病严重程度的预测。CDG 突变所造成的 Alg11 的酶活性与蛋白质稳定性的关联及有关分子机制有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] AEBI M, BERNASCONI R, CLERC S, et al. N-glycan structures: recognition and processing in the ER[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35(2): 74-82.
- [2] SATOH T, YAMAGUCHI T, KATO K. Emerging structural insights into glycoprotein quality control coupled with N-glycan processing in the endoplasmic reticulum[J]. *Molecules*, 2015, 20(2): 2475-2491.
- [3] SCHWARZ F, AEBI M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21(5): 576-582.
- [4] SCHMALTZ R M, HANSON S R, WONG C-H. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(7): 4259-4307.
- [5] AEBI M. N-linked protein glycosylation in the ER[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013, 1833(11): 2430-2437.

- [6] FREEZE H H. Genetic defects in the human glycome[J]. **Nature Reviews Genetics**, 2006, 7(7):537-551.
- [7] PÉANNE R, DE LONLAY P, FOULQUIER F, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? [J]. **European Journal of Medical Genetics**, 2018, 61(11):643-663.
- [8] FERREIRA C R, ALTASSAN R, MARQUES-DA-SILVA D, et al. Recognizable phenotypes in CDG[J]. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 2018, 41(3):541-553.
- [9] BAMMENS R, MEHTA N, RACE V, et al. Abnormal cartilage development and altered N-glycosylation in Tmem165-deficient zebrafish mirrors the phenotypes associated with TMEM165-CDG[J]. **Glycobiology**, 2015, 25(6):669-682.
- [10] NG B G, SHIRYAEV S A, RYMEN D, et al. ALG1 - CDG: Clinical and molecular characterization of 39 unreported patients[J]. **Human Mutation**, 2016, 37(7):653-660.
- [11] WOLTHUIS D, VAN ASBECK E, KOZICZ T, et al. Abnormal fat distribution in PMM2-CDG[J]. **Molecular Genetics and Metabolism**, 2013, 110(3):411-413.
- [12] O'REILLY M K, ZHANG G, IMPERIALI B. In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis[J]. **Biochemistry**, 2006, 45(31):9593-9603.
- [13] AL TENEJI A, BRUUN T U, SIDKY S, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II[J]. **Molecular Genetics and Metabolism**, 2017, 120(3):235-242.
- [14] PEREIRA A G, BAHÍ-BUISSON N, BARNERIAS C, et al. Epileptic spasms in congenital disorders of glycosylation [J]. **Epileptic Disorders**, 2017, 19(1):15-23.
- [15] REGAL L, VAN HASSELT P, FOULQUIER F, et al. ALG11-CDG: Three novel mutations and further characterization of the phenotype[J]. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, 2015, 2:16-19.
- [16] RIND N, SCHMEISER V, THIEL C, et al. A severe human metabolic disease caused by deficiency of the endoplasmatic mannosyltransferase hALG11 leads to congenital disorder of glycosylation-Ip [J]. **Human Molecular Genetics**, 2010, 19(8):1413-1424.
- [17] THIEL C, RIND N, POPOVICI D, et al. Improved diagnostics lead to identification of three new patients with congenital disorder of glycosylation-Ip[J]. **Human Mutation**, 2012, 33(3):485-487.
- [18] FLITSCH S L, PINCHES H L, TAYLOR J P, et al. Chemo-enzymatic synthesis of a lipid-linked core trisaccharide of N-linked glycoproteins[J]. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, 1992, (16):2087-2093.
- [19] WILSON I, TAYLOR J, WEBBERLEY M, et al. A novel mono-branched lipid phosphate acts as a substrate for dolichyl phosphate mannose synthetase[J]. **Biochemical Journal**, 1993, 295(1):195-201.
- [20] LI S-T, WANG N, XU S, et al. Quantitative study of yeast Alg1 beta-1,4 mannosyltransferase activity, a key enzyme involved in protein N-glycosylation[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects**, 2017, 1861(1):2934-2941.
- [21] LI S-T, WANG N, XU X-X, et al. Alternative routes for synthesis of N-linked glycans by Alg2 mannosyltransferase[J]. **The FASEB Journal**, 2018, 32(5):2492-2506.
- [22] 李庆猛, 李盛陶, 王宁, 等. 酵母来源 α -1,2 甘露糖转移酶 Alg11 的异源表达, 纯化和活性分析[J]. **中国生物工程杂志**, 2018, 38(6):26-33.
- [23] LI S T, LU T T, XU X X, et al. Reconstitution of the lipid-linked oligosaccharide pathway for assembly of high-mannose N-glycans[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1):1813.