

分类号: Q78

密 级:

单位代码: 10422

学 号: 202012546



山东大学
SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: **O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰调节 USP1 与 MET1 和 ECR 结合**
O-GlcNAcylation, phosphorylation and acetylation regulate USP1 binding to MET1 and ECR

作者姓名	朱彤
培养单位	生命科学学院
专业名称	生物化学与分子生物学
指导教师	董杜鹃 副教授
合作导师	

2023 年 5 月 18 日

目 录

1 前言.....	1
1.1 类视黄醇 X 受体 RXR 可与多种受体结合介导不同生理过程 ...	1
1.2 翻译后修饰可能是 RXR 与不同受体结合的调节方式	3
1.2.1 磷酸化修饰.....	4
1.2.2 O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰	5
1.2.3 酰基化修饰.....	6
1.3 超气门蛋白 USP 是 RXR 在昆虫中的同源物.....	8
1.4 存在的科学问题、研究内容和研究意义	9
2 O-GlcNAc 修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰调节 USP1 与 MET1 和 ECR 结合	10
2.1 引言.....	10
2.2 实验材料与方法.....	10
2.2.1 实验材料.....	10
2.2.2 实验方法.....	11
2.3 实验结果.....	17
2.3.1 取食期与变态期 USP1 翻译后修饰状态的变化	17
2.3.2 20E 通过 OGA 促进 USP1 第 21 位丝氨酸去除 O-GlcNAc 修饰,继而发生磷酸化	18
2.3.3 O-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合,磷酸化的 USP1 与 ECR 结合.....	19
2.3.4 USP1 的磷酸化与乙酰化互不影响	21
2.3.5 ACAT1 负责 USP1 的乙酰化	22
2.3.6 ACAT1 的转乙酰基功能受到琥珀酰化的调节	24
2.3.7 SIRT5 调控 ACAT1 去琥珀酰化.....	27
2.4 讨论.....	28
2.4.1 不同翻译后修饰的 USP1 分别与 MET1 和 ECR 结合	29
2.4.2 翻译后修饰调节激素信号转导是细胞生理活动应答外界环境的方式之一	30
2.4.3 不同翻译后修饰的上游调节机制.....	31
2.5 结论.....	31
论文创新点总结	32
论文的不足之处	32
参考文献.....	33

摘要

研究背景、科学问题及研究意义

类视黄醇 X 受体 (Retinoid X Receptor, RXR) 是存在于细胞核中的一类受体, 通过与其他受体结合形成同源/异源二聚体复合物直接或间接调节基因表达, 参与糖代谢、胆固醇转运等多种代谢和生理过程。因此, RXR 被认为是治疗糖尿病、神经疾病和肿瘤等疾病的潜在药物靶标。但是 RXR 与不同受体结合的具体机制目前还不清楚。

翻译后修饰 (Post-Translational Modifications, PTMs) 发生在蛋白翻译过程中或翻译过程后, 可通过供体基团与蛋白的共价结合改变蛋白的电荷、构象等, 从而快速调节蛋白功能, 完成细胞对内外信号的应答, 适应机体生理状态的变化。目前, 已发现的翻译后修饰有 600 多种。其中, O 位 N-乙酰葡萄糖胺 (O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc) 修饰、磷酸化、乙酰化、琥珀酰化、泛素化和甲基化等翻译后修饰已被广泛研究。那么, RXR 与不同受体结合是否受到翻译后修饰的调节, 这些修饰之间有着何种关系, 他们的上游调控机制又是什么, 这值得思考。

变态, 指昆虫发育过程中幼虫与成虫形态及内部结构差异显著, 是昆虫适应环境的一种重要方式。变态发育过程受保幼激素 (Juvenile Hormone, JH) 和蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 协同调控。在取食期, JHIII 与其核受体甲氧普林耐受蛋白 1 (Methoprene Tolerant Protein 1, MET1) 结合, 并与磷酸化的热休克蛋白 90 (Heat Shock Protein 90, Hsp90) 和超气门蛋白 (Ultraspiracle, USP) 形成复合物, 与 JH 应答元件 (JH Response Element, kJHRE) 结合, 促进 *Krhl* 等基因的表达, 以维持幼虫状态。在变态期, 20E 滴度上升, 与蜕皮激素核受体 (Ecdysone Nuclear Receptor, ECR) 结合后, 与 USP 形成转录复合物并与蜕皮激素响应元件 (Ecdysone Response Element, ECRE) 结合, 启动 20E 下游基因的表达, 促进变态发育。这个既可以与 MET1 结合又可以与 ECR 结合, 分别介导 JH 和 20E 信号途径的超气门蛋白 USP 是 RXR 在昆虫中的直系同源物。本实验室前期工作证明, 在棉铃虫基因组中鉴定到一种 USP, 与其他物种 USP1 相似度较高, 因此命名为 USP1。棉铃虫 USP1 第 21 位丝氨酸受蛋白激酶 C (Protein Kinase C, PKC) 调节发生磷酸化, 第 303 位赖氨酸发生乙酰化, 且这两种修饰均与 USP1 和 ECR 的结合有关。由此可以看出, USP1 既可以与多种受体结合形成二聚体介导不同的激素信号途径, 同时又具有多种翻译后修饰,

是探索翻译后修饰调节 RXR 与不同受体结合的理想模型。

基于此，本论文以完全变态昆虫棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*, cotton bollworm) 的变态发育过程为研究对象，探究不同翻译后修饰调控 USP1 互作蛋白的选择、多种修饰之间的相互关系及上游调控机制。研究结果可完善 RXR 形成异源二聚体的对象选择机制，还可为药物开发和害虫防治提供参考，在理论和实践中均有重要意义。

研究结果

首先通过免疫印迹实验探索不同发育阶段 USP1 各种翻译后修饰水平的变化，结果表明，USP1 在 6 龄取食期 *O*-GlcNAc 修饰程度较高，而 6 龄变态期磷酸化和乙酰化修饰程度较高。20E 处理可使 USP1 *O*-GlcNAc 修饰水平降低，磷酸化水平上升。进而探索 *O*-GlcNAc 修饰与磷酸化之间的关系，通过 RNA 干扰敲降负责去除 *O*-GlcNAc 修饰的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷水解酶(*O*-GlcNAcase, OGA)，USP1 第 21 位丝氨酸的 *O*-GlcNAc 修饰无法去除，则 20E 无法诱导该位置磷酸化修饰发生。免疫共沉淀实验检查不同翻译后修饰的 USP1 的互作蛋白的选择状况，结果表明，*O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合，磷酸化的 USP1 与 ECR 结合。对磷酸化与乙酰化修饰之间关系的探索发现，突变第 21 位丝氨酸去除磷酸化修饰后，USP1 乙酰化水平不变，突变第 303 位赖氨酸去除乙酰化修饰后，USP1 磷酸化水平不变，两者相互独立互不影响。进一步寻找负责使 USP1 发生乙酰化的酶，敲降几种常见乙酰化酶后，检测 USP1 乙酰化的变化，结果表明与敲降 E1A 结合蛋白 (E1A Binding Protein p300, Ep300) 基因、赖氨酸乙酰转移酶 2A (K(Lysine) Acetyltransferase 2A, KAT2A) 基因、赖氨酸乙酰转移酶 5 (K(Lysine) Acetyltransferase 5, KAT5) 基因相比，敲降线粒体乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1 (Mitochondrial Acetyl-CoA Acetyltransferase 1, ACAT1) 基因后，由 20E 诱导的 USP1 乙酰化受到显著抑制。进一步探索 ACAT1 发挥转乙酰基功能的机制，免疫印迹表明，ACAT1 在取食期和变态期的表达水平没有变化，但琥珀酰化修饰水平降低，将第 238 位赖氨酸突变为精氨酸模拟去除琥珀酰化状态后，ACAT1 与 USP1 结合并使之乙酰化，将其突变为谷氨酸模拟琥珀酰化后，ACAT1 不能与 USP1 结合，并无法使 USP1 乙酰化。敲降沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5 (SIR2-Related Enzyme 5, SIRT5) 基因，ACAT1 琥珀酰化不能去除。

结论

USP1 在幼虫取食期发生 *O*-GlcNAc 修饰，与 JH 核受体 MET1 结合；在变态期发生磷酸化和乙酰化，与蜕皮激素核受体 ECR 结合。*O*-GlcNAc 修饰与磷酸化均发生在 USP1 第 21 位丝氨酸上，且二者此消彼长；磷酸化与乙酰化互不影响。在变态期，OGA 使 USP1 去除 *O*-GlcNAc 修饰进而发生磷酸化，SIRT5 使

ACAT1 去琥珀酰化，去琥珀酰化的 ACAT1 负责 USP1 乙酰化的发生。

关键词：类视黄醇 X 受体；超气门蛋白；磷酸化；O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰；乙酰化；琥珀酰化；20-羟基蜕皮酮

ABSTRACT

Research background, existing scientific questions and research significance

Retinoid X Receptor (RXR) is a type of receptor in the nucleus, which can directly or indirectly regulate gene expression by forming homologous/ heterodimer complexes with other receptors, and participate in various metabolic and physiological processes such as glucose metabolism and cholesterol transport. Therefore, RXR is considered as a potential drug target for treating diseases such as diabetes, neurological diseases and tumors. However, the specific mechanism by which RXR binds to different receptors is still unclear.

Post-Translational Modifications (PTMs) occur during or after protein translation and can be modifications to the charge and conformation of the protein through the covalent binding of the donor group to the protein, so as to quickly adjust the function of the protein and complete the cell's response to internal and external signals. Adapt to changes in the physiological state of the body. At present, more than 600 post-translational modifications have been discovered. Among them, post-translational modifications such as *O*-linked N-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) modification (*O*-GlcNAcylation), phosphorylation, acetylation, succinylation, ubiquitination and methylation have been extensively studied. Therefore, it is worth considering whether the binding of RXR to different receptors is regulated by post-translational modifications, what are the relationships between these modifications, and what are their upstream regulatory mechanisms.

Metamorphosis is an important mode of insect adaptation to the environment. Metamorphosis development is regulated cooperatively by Juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone (20E). During feeding, JHIII binds to methoprene tolerant protein 1 (MET1) and phosphorylated heat shock protein 90 (Hsp90) and ultraspiracle (USP) form a complex that binds to the JH response element (kJHRE) and promotes the expression of *Krhl* and other genes to maintain larval status. In the metamorphosis stage, 20E titer increases, binds with ecdysone nuclear receptor (ECR), forms transcription complex with USP, and binds with ecdysone response element (ECRE). The downstream gene expression of 20E signaling pathway was activated to promote the development of larvae metamorphosis. USP, which can bind to both MET1 and ECR, is the direct homolog of RXR in insects and receives JH and 20E signaling

pathways respectively. Previous laboratory work demonstrated that a species of USP was identified in the genome of *Helicoverpa armigera*, which was highly similar to other species USP1, so it was named USP1. *Helicoverpa armigera* USP1 Ser21 is phosphorylated by PKC and Lys303 is acetylated, both of which are related to the interaction of USP1 and ECR. It can be seen that USP1 can not only bind to a variety of receptors to form dimers mediating different hormone signaling pathways, but also has a variety of post-translational modifications, which is an ideal model to explore the regulation of post-translational modifications on the binding of RXR to different receptors.

Based on this, in this paper, the metamorphosis development process of complete metamorphosis insect *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm) was taken as the research object to explore the selection of different post-translational modifications regulating USP1 interacting proteins, the relationship between various modifications and the upstream regulation mechanism. The results of this study can improve the object selection mechanism of RXR forming heterodimers, and provide reference for drug development and pest control, which is of great significance in theory and practice.

Results

Western blot results showed that the USP1 *O*-GlcNAcylation was higher in feeding stage, while the phosphorylation and acetylation modification were higher in metamorphosis stage. 20E induced the decrease of *O*-GlcNAcylation and the increase of phosphorylation at Ser21 in USP1. Interference with β -N-acetylglucosamine glycoside hydrolase (OGA), which is responsible for removing *O*-GlcNAc, reduces the *O*-GlcNAcylation level in USP1. Co-immunoprecipitation showed that *O*-GlcNAcylation USP1 was bound to MET1, phosphorylated USP1 was less bound to MET1 and more bound to ECR. After the phosphorylation modification was removed by mutation at Serine 21, the acetylation level of USP1 remained unchanged, while the phosphorylation level of USP1 remained unchanged after mutation at lysine 303. Interference of several acetylation enzymes was performed to detect changes in the acetylation state of USP1. The results showed that compared with E1A binding protein p300(Ep300) gene, K(lysine) acetyltransferase 2A(KAT2A) gene, K(lysine)acetyltransferase 5(KAT5) gene, knockdown of Mitochondrial Acetyl-CoA Acetyltransferase 1(ACAT1) gene significantly inhibited 20E-induced acetylation of USP1. ACAT1 expression levels did not change during feeding and metamorphosis, but the level of succinylation was reduced. When lysine at 238 was mutated to arginine, it

could bind to USP1 and acetylate it. When it was mutated to glutamic acid, it could not bind to USP1 and could not acetylate USP1. Interfering SIR2-Related Enzyme 5(SIRT5), ACAT1 succinylation cannot be removed.

Conclusion

USP1 is *O*-GlcNAcylated during larval feeding stage and interacts with MET1. Phosphorylation and acetylation occur during metamorphosis and interact with ECR. Both *O*-GlcNAcylation and phosphorylation occurred at Ser21 of USP1, and the relationship between the two is negative. Phosphorylation and acetylation are independent of each other. During the metamorphosis phase, OGA causes USP1 to remove *O*-GlcNAc and thus phosphorylation, while SIRT5 causes ACAT1 to be desuccinylated and USP1 to undergo acetylation.

Key words: Retinoid X Receptor; Ultraspiracle; *O*-linked N-acetylglucosamine; Phosphorylation; Acetylation; Succinylation; 20-hydroxyecdysone

符号说明

表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description

缩略语	英文全称	中文全称
20E	20-hydroxyecdysone	20-羟基蜕皮酮
6F	feeding stage of sixth instar larvae	6 龄取食期幼虫
6M	metamorphosis molting stage of sixth instar larvae	6 龄变态期幼虫
ACAT1	Mitochondrial acetyl-CoA acetyltransferase 1	线粒体乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	序列比对工具
Br-z7	Broad isoform 7	Broad 的蛋白亚型 z7
BSA	bovine serum albumin	牛血清蛋白
bp	base pair	碱基对
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
Co-IP	Co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O	双蒸水
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砜
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
ECR	ecdysone nuclear receptor	蜕皮激素核受体
ECRE	ecdysone response element	蜕皮激素响应元件
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
ExpASy	Expert Protein Analysis System	专业蛋白质分析系统
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
g	gravity	重力
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
h	hour	小时
HaEpi	<i>Helicoverpa armigera</i> epidermal cell line	棉铃虫表皮细胞系
IM	imaginal midgut	新中肠
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
JH	Juvenile hormone	保幼激素
kDa	kilodalton	千道尔顿

续表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description(continued)

缩略语	英文全称	中文全称
Kr-hr	krüppel homologous protein 1	krüppel 同源蛋白 1
L	liter	升
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani 培养基
LM	larval midgut	幼虫中肠
M	mol per liter	摩尔每升
MET1	methoprene tolerant protein 1	甲氧普林耐受蛋白 1
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
mL	milliliter	毫升
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
ng	nanogram	纳克
NaCl	Sodium chloride	氯化钠
OGA	O-GlcNAcase	β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷水解酶
OGT	O-GlcNAc transferase	β -N-乙酰葡萄糖胺糖基转移酶
ORF	open reading frame	开放阅读框
PBS	phosphate-buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pH	hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor α	过氧化物酶体增植物激活受体 α
PTM	post-translation modification	翻译后修饰
qRT-PCR	quantitative real time PCR	实时定量 PCR
RFP	red fluorescent protein	红色荧光蛋白
RIPA	radio immunoprecipitation assay	放射免疫沉淀
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
s	second	秒
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SIRT5	SIR2-related enzyme 5	沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5
SMART	simple modular architecture research tool	简单分子结构分析工具
TBS	tris-buffered saline	Tris 盐缓冲液
Tris-HCl	tris-hydrochloride	Tris 盐酸盐

续表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description(continued)

缩略语	英文全称	中文全称
USP1	Ultraspiracle isoform 1	超气门蛋白
WB	Western blot	免疫印迹
μg	microgram	微克
μl	microliter	微升
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius	摄氏度

1 前言

1.1 类视黄醇 X 受体 RXR 可与多种受体结合介导不同生理过程

受体蛋白可以传递细胞内外信号刺激，协助细胞完成对刺激的应答。细胞外信号分子（激素、代谢物、神经递质等）与细胞膜受体特异性结合，将胞外信号转变为胞内信号，并通过胞浆受体和核受体在细胞内完成信号传递，细胞对信号分子做出反应，实现细胞与细胞外环境以及细胞与细胞之间的交流[1]。鉴于其在信号通路中的重要性，受体蛋白成为越来越多的疾病的治疗靶标。核受体蛋白（NRs）存在于细胞核中，通过调节相关基因的表达介导一系列复杂的生理代谢途径[2]。

类视黄醇 X 受体（Retinoid X Receptor, RXR）是细胞核受体中的一类，最早在小鼠中鉴定到 α 、 β 、 γ 三种亚型。RXR α 主要在肝、肾、脾等多种内脏组织中表达；RXR β 表达广泛，几乎在所有组织中都有表达；RXR γ 在肌肉和大脑中表达丰富[3]。RXR α 有 4 种异构体，RXR β 也鉴定到了 4 种异构体，而 RXR γ 只有两种[4]。组织表达的特异性与变体的丰富性暗示着 RXR 在不同组织中发挥着不可替代的功能，在调节生理和病理过程中发挥着重要作用。与一般核受体结构域相似，RXR 含有一个保守性差、长度可变的 N 端结构域（NTD, 结构域 A/B），包括不依赖配体的辅激活因子激活结合区域（AF-1）；一个高度保守的 DNA 结合域（DBD, 结构域 C），它介导 RXR 与特定的 DNA 序列结合；一个铰链（Hinge, 结构域 D）连接 DNA 和配体结合域；一个高度保守的配体结合域（LBD, 结构域 E），包括依赖配体的辅激活因子（CoAs）或辅抑制因子（CoRs）激活结合区域（AF-2）[5]。

RXR 通过与不同的受体相互作用，调节基因的表达，参与多条信号通路，介导多种生理生化过程。例如，RXR 可与甲状腺激素受体（Thyroid Hormone Receptors, TRs）相互作用形成异源二聚体，进而结合到甲状腺激素反应元件（Thyroid Hormone Response Elements, TREs）上，调控下游基因的转录[6]。在正转录调控过程中，TH（配体）结合的 TR/RXR 募集共激活因子和组蛋白乙酰转移酶（Histone Acetyltransferase, HAT），使组蛋白乙酰化，染色质变为更加开放的构象，促进基因的转录。而在负转录调控时，TH（配体）结合的 TR/RXR 召集共抑制因子和组蛋白去乙酰化酶（Histone Deacetylase, HDAC），使染色质变为封闭的构象，抑制基因的转录。没有配体结合的 TR/RXR 也可以结合到 TREs

上,它同样会招募共抑制因子和 HDAC,阻遏基因的表达[7]。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , PPARs) 是 RXR 另一个重要的配体,其主要在心血管系统中表达[8],负责脂肪酸和糖类的分解代谢以及细胞的增殖和分化[9]。PPAR γ /RXR α 异源二聚体结合到 DNA 反应元件 (PPRE) 上,被 RXR 内源性配体激活后,葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)、硬脂酰辅酶 a 去饱和酶 1 (SCD1)、线粒体肉碱棕榈酰转移酶 (MCPT) 等糖代谢基因被上调表达, GLUT4 允许葡萄糖进入细胞,葡萄糖摄取量增加,糖异生减少,从而维持血糖稳态[10]。在非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 小鼠模型中,分别使用 RXR 或 PPAR γ 的配体治疗小鼠时,两者都可以显著降低血清甘油三酯水平,当同时使用两种配体药物处理后,血清甘油三酯水平降低幅度更大[11]。此外,患有 NIDDM 疾病的人还会伴随着肾病、神经病等,因此, RXR 被认为是治疗糖尿病、神经疾病和肿瘤等疾病的潜在药物靶标。

RXR 的蛋白伙伴还包括维生素 D3 受体 (Vitamin D3 Receptors, VDRs)、视黄酸受体 (Retinoic Acid Receptors, RARs) 和肝 X 受体 (Liver X Receptors, LXRs) 等[12, 13]等。这些受体形成的异源二聚体又可以被粗略的分为两类,“permissive”和“non-permissive”。在单独存在 RXR 选择性配体 (“rexinoid”) 或 NR 配体时,具有转录活性的异源二聚体为 “permissive”,例如 PPAR/RXR 和 LXR/RXR。而 RAR/RXR, VDR/RXR 和 TR/RXR 对单独的 rexinoids 无反应,须通过与伴侣配体协同激活转录,这些异源二聚体被认为是 “non-permissive” [14]。

RXR 异二聚体结合的 DNA 序列由 AGGTCA 直接重复 (Direct Repeats, DRs) 组成,根据直接重复序列之间间隔的核苷酸数量,将 DRs 分为 DR1-5[4]。TRE 由间隔 4 个核苷酸的直接重复序列组成,即 DR4,并在小鼠中得到表征,为 AGGTGAagtGAGGTCA [15]。RXR 同源二聚体和 PPAR/RXR 异二聚体与 DR1 基序结合, DR2 和 DR5 基序是 RXR/RAR 异二聚体结合的优先选项, DR3 偏向于与 RXR/VDR 异二聚体结合[16, 17]。然而,这一规律并不是一成不变的。例如, RXR/RAR 异二聚体也可以结合到 DR4 基序[18]。

RXR 多以异源二聚体[19]形式存在,同源二聚体[20]和同源四聚体[21]也被认为有活性,但是很少出现非配对的单体[22]。尽管对于 RXR 的互作蛋白研究很多,但是 RXR 形成异源二聚体的对象选择机制目前还不清楚。

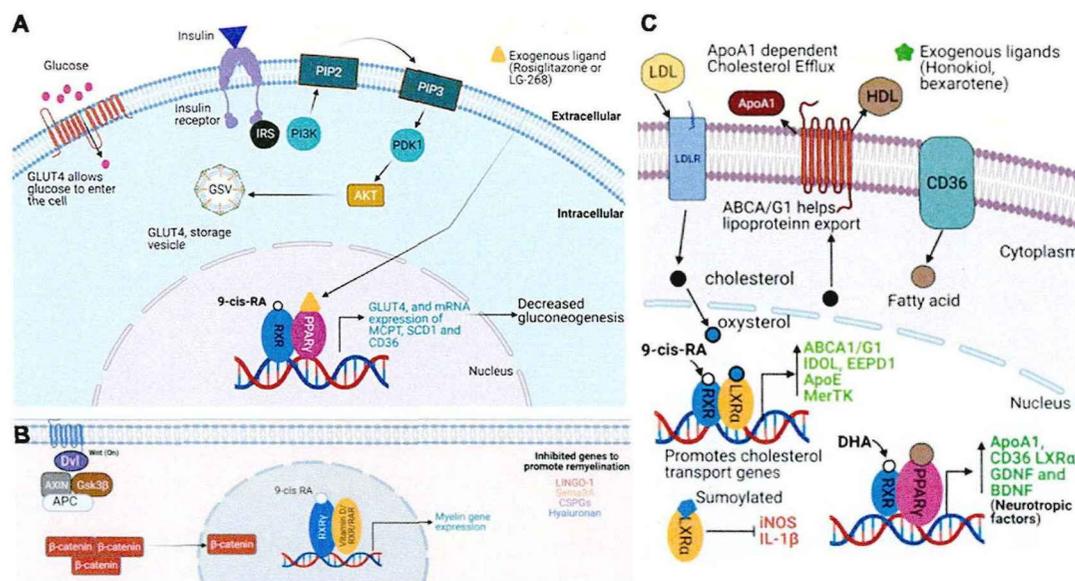


图 1-1 RXR 与不同受体相互作用。

Fig. 1-1 RXR interacted with different ligands

注：(A) RXR 与 PPAR γ 相互作用。(B) RXR 与 LXR α 相互作用。(C) RXR 与 VDR 相互作用。图片来源[23]

Notes: (A) RXR interacted with PPAR γ . (B) RXR interacted with LXR α . (C) RXR interacted with VDR. Image Source[23]

1.2 翻译后修饰可能是 RXR 与不同受体结合的调节方式

翻译后修饰通过将功能基团共价连接到蛋白特定的氨基酸残基上，从而改变蛋白的构象、电荷、蛋白间相互作用等理化性质，是一种快速调节蛋白质功能的机制，参与调节包括细胞增殖、自噬、凋亡在内的多种生物过程。RXR 多个位点发生磷酸化，如 Ser22[24]，Ser49/Ser78[25]，Ser260[26]等。Ser260 磷酸化的 RXR 与 VDR 结合减少，导致 RXR/VDR 异源二聚体的核易位减少，进而影响与染色质的结合，抑制维生素 D 途径，导致癌细胞中细胞增殖无法得到抑制[27]。由此推测，RXR 与不同受体的结合可能受到翻译后修饰的影响。RXR α 还会发生乙酰化修饰[28]，但其是否影响 RXR 与不同受体的结合目前还没有报道。由于，RXR 的磷酸化和乙酰化已有报道，那么接下来，本研究主要探讨磷酸化、与磷酸化修饰相同的丝氨酸残基的 O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰和乙酰化修饰。

1.2.1 磷酸化修饰

磷酸化是一种普遍的常见的重要的翻译后修饰,磷酸基团主要来自于腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)或腺嘌呤核苷三磷酸(GTP)的 γ 位置,由蛋白激酶催化将磷酸基团转移到蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上,由磷酸酶水解下来[29]。已知的蛋白激酶多达 1000 多种,磷酸酶也有 500 多种[30]。根据磷酸化的氨基酸残基进行分类,大体可以将激酶分为三类,分别为丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶以及可以作用于这三种氨基酸残基的激酶[31]。

蛋白激酶 C (Protein Kinase C, PKC) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类,可被 Ca^{2+} 和磷脂激活,在细胞增殖和凋亡中有着不可替代的作用[32]。PKC δ 是新型 PKC 亚家族的一名成员,它的激活不需要 Ca^{2+} 的参与。PKC δ 由一个调节区和一个催化区构成。调节区主要由保守区 C1 和 C2 组成,C1 区可结合二酰基甘油(DAG)和佛波醇酯(PS),与酶的激活有关[33, 34]。PKC δ 的 C2 区与传统 PKC 的 C2 区结构类似,但是缺少与 Ca^{2+} 作用的氨基酸,因此不能响应 Ca^{2+} 的刺激。催化区主要有保守区 C3 和 C4 组成,负责一些底物如 ATP、蛋白质的识别与结合[34]。调节区和催化区由铰链区连接,该区含有半胱天冬酶的作用位点,在凋亡过程中, caspase-3 蛋白水解将 PKC δ 分解为大小为 41kDa 催化片段和 38kDa 调节片段[35]。

多种蛋白可被 PKC 催化发生磷酸化,影响酶活、蛋白互作等过程。Yuan 等人发现,PKC δ 可以使组蛋白乙酰转移酶 CBP/p300 的 Ser89 发生磷酸化。将该位点突变后,野生型 CBP/p300 的酶活性降低,而突变型的酶活性不受影响,酶活性的降低进一步导致转录活性的下降,这可能与 CBP/p300 的构象变化有关[36]。Rad9 是一种高度保守的细胞周期监控点控制蛋白,参与 DNA 的损伤修复和细胞凋亡等过程。对人骨肉瘤细胞进行基因毒剂 ara-C 处理,发现 PKC δ 易位至细胞核并与之结合使 Rad9 发生磷酸化,磷酸化的 Rad9 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 相互作用增加,促进 Rad9 介导的细胞凋亡的进程。而表达失活的 PKC δ 时, Rad9 与 Bcl-2 的结合是减少的[37]。

在昆虫中,PKC 诱导超气门蛋白(Ultraspiracle, USP)和蜕皮激素核受体(Ecdysone Nuclear Receptor, ECR)的磷酸化,促进二者的相互作用。伴随着昆虫生长发育的进行,蜕皮激素 20E 的浓度在变态期达到最大。20E 通过响应蜕皮激素的 G 蛋白偶联受体(ErGPCRs)进入细胞,引起一系列级联反应,最终通过 ECR 和 USP1 形成复合物与蜕皮激素响应元件(Ecdysone Response Element, ECRE)结合上调 PKC δ 的表达,过度表达的 PKC δ 发生自磷酸化并易位于细胞核,磷酸化 ECR 的 T468 处。磷酸化的 ECR 与磷酸化且乙酰化的 USP1 相互作用

用形成 ECR/USP1 转录复合物,与 ECRE 结合后,促进凋亡相关基因的转录[38]。而且, USP1 的磷酸化也是由 PKC 负责的。ErGPCR 将 20E 信号转导至酪氨酸激酶 Src 家族,激活磷脂酶 C γ 1 (PLCG1),使其向细胞膜易位,产生 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP3) 和 DAG,并触发钙信号的传导,DAG 和 Ca²⁺激活 PKC,活化的 PKC 诱导 USP1 第 21 位丝氨酸发生磷酸化,促进 USP1 与 ECRE 的相互作用[39]。

除 PKC 外,钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II, CAMKII) 也在昆虫中诱导蛋白的磷酸化,组蛋白去乙酰化酶 (Zn²⁺-Dependent Histone Deacetylases, HDACs) 是其作用靶标。20E 通过 ErGPCR、PLC 以及 Ca²⁺通路等途径诱导 CaMKII 磷酸化,磷酸化的 CaMKII 部分定位到细胞核中,使 HDAC 磷酸化并使其易位至细胞质中,从而使 USP1 免于去乙酰化的命运,与 ECR 相互作用,促进变态的发生[40]。

蛋白的构象,蛋白与蛋白、蛋白与 DNA 之间的相互作用,定位等都会受磷酸化的影响而发生改变,因此磷酸化在细胞生长、分化、自噬、凋亡等过程生物过程中扮演着十分重要的角色,从而在多种疾病,特别是癌症的治疗中有着举足轻重的地位[41]。

1.2.2 O 位 N-乙酰葡萄糖胺修饰

与磷酸化修饰相似, O-GlcNAc 修饰也是发生在丝氨酸和苏氨酸残基上的一种快速可逆的修饰。与一般的糖基化不同, O-GlcNAcylation 是简单的单糖修饰[42]。它的糖基供体来源于尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-N-Acetylglucosamine, UDP-GlcNAc), UDP-GlcNAc 经由己糖胺生物合成途径 (Hexosamine Biosynthetic Pathway, HBP)[43]整合糖代谢、氨基酸代谢、脂代谢以及核酸代谢产物生成[44]。另外,与其他翻译后修饰不同的是,细胞质、线粒体和细胞核中的蛋白而非细胞膜上的蛋白更易发生 O-GlcNAcylation[45]。而且 O-GlcNAcylation 修饰仅由 2 种高度保守的酶调控—— β -N-乙酰葡萄糖胺糖基转移酶 (O-GlcNAc Transferase, OGT) 和 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷水解酶 (O-GlcNAcase, OGA) [46]。OGT 负责将 UDP-GlcNAc 添加到蛋白质的氨基酸残基上[47, 48], 而 OGA 负责将 UDP-GlcNAc 水解下来[49], 但是对 OGT 和 OGA 的上游调控因素目前还知之甚少。

O-GlcNAc 修饰于 1984 年被 Hart 首次报道[42], 随着对其深入的研究, 发现了 O-GlcNAc 修饰调节蛋白的亚细胞定位、转录因子的转录活性等功能。例如, Seo 等人研究发现, OGT 的核输入由 3 个氨基酸 (DFP) 充当核定位信号, 并通过 DFP 与输入蛋白 α 5 相互作用完成。而且, 核定位还与 Ser389 的 O-GlcNAc 修饰有关。将 Ser389 突变为甘氨酸后, 分别用 OGA 抑制剂 Thiamet-G 和 OGT 抑

制剂 5-thio-GlcNAc 处理细胞，发现 Thiamet-G 处理组中野生型核定位增加，突变型核定位减少；5-thio-GlcNAc 处理组中，野生型核易位减少，突变型核易位几乎消失[50]。此外，OGA 自身也会在 Ser398, Ser399, Ser405, Ser410 和 Thr415 发生 O-GlcNAc 修饰，但目前作用未知[51]。除了 OGT 和 OGA 外，一些转录因子也受到 O-GlcNAc 修饰的调节。例如，葡萄糖可以通过底物依赖的方式上调 OGT 的活性，OGT 使肝脏中的叉头框转录因子 1 (Forkhead Box O 1, FOXO1) Ser318、Ser550、Ser654、Thr317、Thr648 位点发生 O-GlcNAcylation，从而激活 FOXO1 的转录活性，增加糖异生相关基因磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (G6PC) 以及清除自由基相关基因过氧化氢酶 (CAT) 和锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 的表达，以响应营养状态的变化。在糖尿病大鼠模型中，FOXO1 是被高度 O-GlcNAc 修饰的[52]。

此外，它还能修饰通过修饰包括热休克蛋白[53]、RNA 聚合酶 II [54]在内的多种蛋白、酶以及转录因子[55]参与蛋白质功能调节和信号转导，从而被应用于糖尿病[56]、癌症[57]、神经退行性疾病[58]等疾病的治疗，具有广泛的研究前景。

1.2.3 酰基化修饰

在组成蛋白质的氨基酸中，赖氨酸残基发生翻译后修饰的频率较高。其中，大部分修饰是酰基化修饰，例如乙酰化、丙酰化、丁酰化、琥珀酰化等[59]。酰基化的供体——酰基辅酶 A 主要来自于葡萄糖、脂肪酸和氨基酸代谢所产生的中间产物，蛋白酰基化水平的高低与酰基 CoA 的浓度密切相关，因此，酰基化修饰作为营养传感器，对代谢状态的变化十分敏感[60]。

1.2.3.1 乙酰化修饰

蛋白质的赖氨酸乙酰化是经酶或非酶的催化，将乙酰基转移到蛋白的赖氨酸残基的修饰，底物来自糖、脂、氨基酸代谢产生的乙酰辅酶 A，乙酰化水平受底物浓度的影响。人们首先在组蛋白中发现了乙酰化[61]。随后，于 1997 年，在非组蛋白 p53 中也发现了乙酰化[62]。催化乙酰基转移的酶主要由既可以使组蛋白乙酰化又可以使非组蛋白乙酰化的 GCN5 (包括 GCN5 和 PCAF)、p300 (包括 CBP 和 p300)、MYST 家族蛋白 (包括 TIP60、MOZ、MORF、HBO1 和 MOF) 和专门使非组蛋白乙酰化的线粒体乙酰辅酶 A 转移酶 1 (Mitochondrial Acetyl-CoA Acetyltransferase 1, ACAT1) 构成[63]。ACAT1 定位于细胞质和线粒体，通过发挥转乙酰基的功能，参与脂肪酸 β 氧化的最后一步以及酮生酮解的过程[64, 65]。ACAT1 可以使酶、转录因子等发生乙酰化。据已有研究表明，在癌细胞中，ACAT1 使丙酮酸脱氢酶磷酸酶 (Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase, PDP1) 和丙酮酸脱氢酶 α 亚基 (Pyruvate Dehydrogenase Alpha, PDHA1) 发生乙酰化，导致 PDP1

与 PDHA1 分离, PDHA1 又会招募丙酮酸脱氢酶激酶 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase, PDK), 由于 PDHA1 的乙酰化抑制了其自身的磷酸化, 导致丙酮酸脱氢酶复合物 (Pyruvate Dehydrogenase Complex, PDC) 活性降低[66]。转录因子 EB(Transcription Factor EB, TFEB)被 ACAT1 乙酰化后转录活性升高[67]。

在昆虫的变态发育中, USP1 第 303 位赖氨酸的乙酰化可以促进其与 ECR 异二聚体的形成以及与 ECRE 的结合, 激活下游基因的转录, 完成变态发育[40]。但其由何种酶催化发生乙酰化目前还不清楚。

乙酰基的去除主要由 NAD⁺依赖的沉默信息调节因子 (Silent Information Regulators, SIR2) 家族蛋白以及 Zn²⁺依赖的组蛋白去乙酰化酶 (Histone Deacetylases, HDACs) 负责[68]。SIR2 家族蛋白共有 7 个成员, 它们的亚细胞定位和酶活性各不相同[69]。SIRT1 和 SIRT6 位于细胞核中[70, 71], SIRT2 位于细胞质中[72], SIRT3、SIRT4、SIRT5 定位于线粒体中[73], SIRT7 位于核仁中[70, 74]。SIRT1、SIRT2 和 SIRT3 主要表现出去乙酰化酶的活性[69], SIRT4 具有去甲基戊二酰化和羟甲基戊二酰化的酶活性[75], SIRT5 去琥珀酰化、丙二酰化和戊二酰化的活性更高[76-78], SIRT6 能有效的去除长链脂酰基[79], SIRT7 可以调节组蛋白的去乙酰化、去琥珀酰化和去戊二酰化[80-82]。在昆虫细胞中, HDAC3 的过表达导致 USP 乙酰化水平的下降[40]。

总而言之, 乙酰化修饰在调控基因的转录、蛋白的活性等过程中有着十分重要的作用, 具有广泛的研究意义。

1.2.3.2 琥珀酰化修饰

琥珀酰化也是经常发生在赖氨酸残基的一种翻译后修饰, 相比于乙酰化的广泛研究, 关于琥珀酰化的报道较少。琥珀酰基来自于代谢产生的琥珀酸和琥珀酰辅酶 A, 大小为 100 Da, 带有两个负电荷 [83]。与乙酰化修饰一致的是, 琥珀酰化也受到酶和非酶的调控[84]。

多种酶催化琥珀酰化的发生。例如, 赖氨酸乙酰基转移酶 2A (Lysine Acetyltransferase 2A, KAT2A)于 2017 年被发现可以促进细胞核中组蛋白的琥珀酰化[85]。肉碱棕榈酰转移酶 1 A (Carnitine Palmitoyltransferase 1 A, CPT1A)于 2018 年被发现具有转运长链脂肪酸和赖氨酸琥珀酰基转移酶的活性[86]。组蛋白乙酰转移酶 1 (Histone Acetyltransferase 1, HAT1)于 2021 年被发现可以调节组蛋白和非组蛋白上的赖氨酸琥珀酰化[87]。

去琥珀酰化主要由沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5 (Sirt2-Related Enzyme 5, SIRT5) 负责[77]。SIRT7 表现出组蛋白去琥珀酰化的活性[81]。

胃癌细胞蛋白 S100A10 的琥珀酰化促进了肿瘤细胞的侵袭和转移。SIRT5 的过表达和敲降实验可以说明, S100A10 的琥珀酰化的去除受 SIRT5 调控, 且通过过

表达 CPT1A 得出其作为 S100A10 的琥珀酰化酶的结论, 将 S100A10 赖氨酸 47 位分别突变为谷氨酸和精氨酸以模拟琥珀酰化和去琥珀酰化状态, 两种突变体的琥珀酰化水平均下降, 但 K47E 突变体的细胞侵袭能力仍然存在, 这一结果使得琥珀酰化通过改变蛋白的电荷而影响蛋白的性质的想法得到肯定[88]。

琥珀酰化还可以改变酶的活性。例如 SIRT5 的失活导致线粒体丝氨酸羟甲基转移酶 (Serine Hydroxymethyltransferase, SHMT2) 维持琥珀酰化, 琥珀酰化的 SHMT2 活性降低, 催化丝氨酸分解代谢速度减缓, 从而抑制癌细胞的生长[89]。

综上所述, 磷酸化、O-GlcNAc 修饰、酰基化等翻译后修饰都可以通过改变蛋白的构象、电荷等理化性质调节蛋白之间相互作用, 其是否为调节 RXR 与不同受体的相互作用的机制还有待探究。

1.3 超气门蛋白 USP 是 RXR 在昆虫中的同源物

昆虫的生长和变态发育是一个极其复杂的过程, 涉及包括保幼激素 (Juvenile Hormone, JH) 和 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 在内的多种激素的调控。JH 由咽侧体中的线粒体和平滑内质网合成, 在幼虫期含量保持较高水平, 蛹期急剧下降, 羽化后再次上升[90]。1986 年, 在果蝇体内发现了甲氧普林耐受基因 (Methoprene-Tolerant, MET) [91], 其编码的蛋白 MET 是 basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Per-Arnt-Sim (PAS) 家族成员, 转导 JH 信号[92]。结合 JH 的 MET 与另一个 bHLH-PAS 家族蛋白 Taiman(TAI; SRC; FISC)形成异二聚体 [93] 并结合到 JH 应答区域, 激活包括 Krüppel 同源蛋白 1 (Krüppel-Homolog 1, Krh1)在内的多种基因的表达, 抑制响应 20E 的基因如 *Br* 等的表达, 维持幼虫状态 [94, 95]。也有研究表明, JHIII 可通过 PLC-PKC 途径诱导热休克蛋白 Hsp90 发生磷酸化并与 MET1 相互作用, 此时, MET1 也与 USP1 相互作用, 由 Hsp90、MET1 和 USP1 形成的复合物与 JH 应答元件 (Response Element, kJHRE) 结合, 促进 Krh1 等基因的表达, 以维持幼虫状态[96, 97]。另外, JH 也通过 MET 调节雌性信息素的产生和交配, 对于物种的繁衍有着不可或缺的作用[98]。蜕皮激素诱导昆虫蜕皮和变态发育过程, 是由胆固醇或固醇制成的多羟基甾体[99]。蜕皮激素通常来自前胸腺, 由组织中的蜕皮素 20-单加氧酶进一步羟基化为 20-羟基蜕皮素(20E), 20E 被认为是蜕皮激素的活性形式[100]。ECR 是 20E 的核受体, 与核受体家族另一成员 USP 形成同源二聚体, 特异性识别 ECRE 并与之结合[101], 启动 *Ecr*、*Usp*、*Br-z7* 等变态相关基因的表达, 为变态发育做好充足的准备[38, 102]。

USP 是 RXR 的昆虫同源物, 起初在果蝇中作为一种转录因子被发现[103], 是核激素受体家族成员, 具有典型的核受体结构域[104, 105]。与 RXR 相似, USP 介导类固醇激素信号途径。在棉铃虫生长发育过程中, 类固醇激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 在变态蜕皮期滴度上升, 其生物活性通过 USP 和 ECR 形成异源二聚体与 ECRE 结合介导信号传递[106]。在果蝇中, 只存在一个 USP[107]; 存在三种 ECR 异构体, 分别为 ECRA、ECRB1 和 ECRB2。它们具有相同的 DNA 结合域和激素结合域, 但 N 端是不同的[108]。在家蚕中, 只鉴定到了一种 USP 的同源物——CF1[109]; 鉴定到 ECR 存在三种异构体: ECR-A、ECR-B1 和 ECR-B2[110]。在烟草天蛾中, USP 存在两种异构体, 分别为 USP1 和 USP2[111]; ECR 存在两种异构体, 分别为 ECR-A 和 ECR-B1[112, 113]。在埃及伊蚊中, 存在两种 USP 异构体: USP_a 和 USP_{1b}[114]; 存在两种 ECR 异构体: ECRA 和 ECRB。[115]。在棉铃虫基因组中找到个 1 个 USP, 与其他物种 USP1 进行序列比对后, 将其鉴定为 USP1[116]。

已有的研究表明, USP1 可以在不同条件下分别与不同受体结合, 调节下游基因转录。在棉铃虫取食期时, 保幼激素 JH 水平升高, 上调 MET1 的表达, JH 与 MET1 结合后诱导 USP1 与 MET1 相互作用, 促进 *Krhl* 等下游基因的转录, 促进幼虫的生长[97]。而到了变态蜕皮期, 蜕皮激素 20E 水平升高, 上调 USP1 的表达, 并促进其发生磷酸化和乙酰化, 20E 与 ECR 结合后促进与 USP1 的结合, 促进 *Hr3* 等下游基因的转录, 促进变态发育[38, 40]。

1.4 存在的科学问题、研究内容和研究意义

RXR 是一类重要的核受体, 它在不同的生理状态下与不同的受体相互作用, 与激素信号的传达和生理代谢的调控有着密不可分的联系, 但是其相互作用受体的选择机制目前尚未阐明。翻译后修饰可以快速调节蛋白功能, 且 RXR 发生磷酸化和乙酰化修饰, 那么 RXR 的相互作用受体的选择机制是什么? 是否受到翻译后修饰的调节?

超气门蛋白 USP 是 RXR 的昆虫同源物, 可与 MET、ECR 等不同受体结合介导保幼激素、蜕皮激素等不同信号途径从而调节昆虫变态发育, 且 USP 存在磷酸化、乙酰化等多种翻译后修饰形式, 因此本研究以昆虫变态发育为模型, 探索翻译后修饰调节 USP 与 MET1 和 ECR 结合的详细机制。

本文以鳞翅目昆虫棉铃虫为实验对象, 首先通过免疫沉淀和免疫印迹检测 USP1 在棉铃虫取食期和蜕皮变态期 O-GlcNAc 修饰、磷酸化和乙酰化状态的变

化。然后，通过点突变确认翻译后修饰的位点，分析翻译后修饰之间的关系，并探究不同翻译后修饰的 USP1 与 MET1 和 ECR 结合的情况。最后，通过 RNA 干扰敲降负责去除 O-GlcNAc 修饰的酶 *Oga* 和乙酰基转移酶 *Acat1* 以探究 O-GlcNAc 修饰和乙酰化修饰的上游调节机制。

综上，以昆虫变态发育为模型探索翻译后修饰调节 USP1 与 MET 和 ECR 结合的情况及上游调控机制，有助于阐明 RXR 与不同受体相互作用的机制，同时对药物开发和害虫防治也有参考价值。

2 O-GlcNAc 修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰调节 USP1 与 MET1 和 ECR 结合

2.1 引言

完全变态昆虫棉铃虫是一种常见的鳞翅目农业害虫，其一生要经历卵、幼虫、蛹和成虫四个阶段，保幼激素 JH 和蜕皮激素 20E 协同调控棉铃虫的生长和变态发育。作为 RXR 的昆虫同源物，USP1 既可以与保幼激素核受体 MET1 形成异源二聚体，调控 JH 信号途径下游基因的转录促进幼虫生长，又可以在 20E 的诱导下与蜕皮激素核受体 ECR 结合形成异源二聚体，调控 20E 信号途径下游基因的转录。除此之外，USP1 具有磷酸化、乙酰化等多种翻译后修饰，且这两种修饰均与 USP1 和 ECR 的结合有关。本文通过探究 USP1 在不同翻译后修饰状态下与 MET1 和 ECR 结合的机制，翻译后修饰之间的关系及其上游的调节机制，为深入了解 RXR 与不同受体相互作用的机制提供了新的方向，为疾病的治疗提供新的作用靶标，为农业害虫的防控提供新思路。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 实验动物

棉铃虫自河南科云生物购入，喂养人工饲料，饲料由黄豆粉、面粉、酵母、葡萄糖、蔗糖以及多种维生素组成。在饲养期间，保持养虫室温度为 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-70%，光照时间 14 h，黑暗时间 10 h[117]。

2.2.1.2 实验细胞

实验中使用的棉铃虫表皮细胞系 (*Helicoverpa armigera* epidermal cell line , HaEpi)于含有 10%胎牛血清(FBS)的 Grace 培养基中培养,培养箱温度为 27°C。

2.2.1.3 实验试剂

DNA 聚合酶及 buffer, dNTP, RNA 提取试剂 Transzol、2×SYBR real-time PCR pre-mixture (全式金, 北京, 中国), 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒 (捷瑞, 上海, 中国), 二甲基亚砜 DMSO (索莱宝, 北京, 中国), 20E (Caymanchem, 密歇根州, 美国), 昆虫 Grace 培养基 (Gibico, 纽约, 美国), 胎牛血清 (Biological Industries, 以色列), 转染试剂 QuickShuttle-enhanced (博奥龙, 北京, 中国), RIPA 裂解液 (碧云天, 北京, 中国), 磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂 (康为世纪, 北京, 中国), 反转录试剂盒 (Abm, Vancouver, 加拿大), dsRNA 合成试剂盒、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、蛋白 marker26616、限制性内切酶及 buffer (Thermo Fisher Scientific, 马萨诸塞州, 美国), His 柱 (天地人和, 常州, 中国), Protein A/G (Santa Cruz, 得克萨斯州, 美国), 卡那霉素、氨苄青霉素、IPTG、引物 (生工, 上海, 中国), T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs, 马萨诸塞州, 美国), ECL 化学发光液 (天能, 上海, 中国), 辣根标记山羊抗兔 Ig G、辣根标记山羊抗鼠 Ig G (中杉金桥, 北京, 中国), O-GlcNAcylation 鼠多克隆抗体、泛琥珀酰化兔单克隆抗体 (景杰生物, 杭州, 中国), ACTB 兔多克隆抗体 (Abclonal, 武汉, 中国), 抗磷酸化-PKC 底物丝氨酸多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 马萨诸塞丹弗斯, 美国), 抗磷酸-酪氨酸单克隆抗体 (Abcam, 剑桥, 英国), 泛乙酰化兔多克隆抗体 (Immunechem, 不列颠哥伦比亚, 加拿大), His/GFP/RFP 单克隆抗体 (ABclonal, 武汉, 中国), 其他常用试剂均为国产分析纯产品。

2.2.1.4 实验仪器

高速冷冻离心机 (Eppendorf, Hamburg, 德国), 电泳仪 (六一仪器, 北京, 中国), 金属浴、蛋白电泳槽、转膜仪 (凯奥, 北京, 中国), Tanon 5200 全自动化学发光成像分析系统、Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计 (天能, 上海, 中国)。PCR 仪 (Biometra T-Gradient Thermblock, 德国), 荧光定量 PCR 仪 (Analytik Jane, 德国), 常温离心机 (湘仪, 长沙, 中国)。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 组织蛋白提取

选取不同龄期的幼虫, 解剖分离得到表皮、中肠和脂肪体组织, 称取等量组织, 与无菌的磷酸缓冲盐溶液 (phosphoric acid buffer solution, PBS) (2.7 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KHPO₄) (加入 1%蛋白酶抑制剂混合物

和 1%磷酸酶抑制剂混合物)一并置入玻璃研磨器中,在冰上充分研磨后,于 4°C 12000 rpm 离心 15 min,收集上清即为蛋白样品。

2.2.2.2 免疫沉淀

按上述步骤将蛋白提取出来的过程中,用无菌 PBS 洗涤 Protein A,在 4°C 四维旋转摇床上摇 5 min 后,4°C 3000 rpm 离心 5 min,弃上清加入新的 PBS,洗涤 3 次。最后一次离心结束后将蛋白上清移至含有 10 μ l Protein A 柱料的离心管中,在 4°C 四维旋转摇床孵育 1 h 以完成非特异性吸附。孵育结束后,4°C 3000 rpm 离心 5 min,取上清置于新的离心管中,并以 1:100 比例加入相应抗体,在 4°C 四维旋转摇床孵育 3 h。结束后,4°C 3000 rpm 离心 5 min,将上清移至含有 20 μ l Protein A 柱料的离心管中,在 4°C 四维旋转摇床孵育过夜。第二天,用无菌 PBS 洗涤结合抗原-抗体复合物的 Protein A 2-3 次,最后加入 40 μ l PBS 和 20 μ l 蛋白处理液,100°C 煮 10 min。

2.2.2.3 免疫印迹

将得到的蛋白经 SDS-PAGE 后,电转至硝酸纤维素膜上。完成后,将膜置于封闭液(5%奶粉/3%BSA)中,在室温下封闭 1 h。然后,将膜与不同抗体室温孵育 5-10 min,完成后置于 4°C 过夜。翌日,将膜置于平面摇床上用 TBST (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween, pH7.5)洗涤 3 次,每次 10 min,然后,以 1:3000 的比例将辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠的 IgG 二抗置于缓冲液(与一抗的缓冲液相同)中,室温孵育 30 min 后,转移至 37°C 烘箱中再孵育 30 min。结束后,再用 TBST 洗涤三次, TBS (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5)洗涤一次,每次 10 min。最后,使用 ECL 化学发光液,化学发光成像后进行观察。

2.2.2.4 基因在棉铃虫表皮细胞系中的过表达

按照转染试剂说明(Biodragon, 北京, 中国)将 8-10 μ l 转染试剂和 5 μ g 过表达质粒分别与 100 μ l 无菌的 0.9%生理盐水混合均匀,然后再将含有转染试剂和过表达质粒的生理盐水混合,于室温静置。向六孔板中密度约为 70-80%的 HaEpi 细胞加入 2 ml 新 Grace 培养基,然后,将静置完成的生理盐水加入培养基中,按“十”字型慢慢摇晃,直至混匀。

2.2.2.5 dsRNA 的合成

在目的基因序列中选取长约 400 bp 的片段,设计引物 *dsAcat1* (F)和 *dsAcat1* (R),以棉铃虫脂肪体 cDNA 为模板,使用 HiFi 酶扩增。抽提 PCR 产物,得到的 DNA 片段进行 *dsRNA* 的合成。合成体系如下: 2.4 μ l A/C/G/UTP (10 mM), 2-3 μ g DNA 片段, 20 μ l 5 \times 转录缓冲液, 3 μ l T7 RNA 聚合酶 (20 U/ μ l), 3 μ l RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ l), 补充无 RNA 酶水至总体积为 50 μ l, 37°C 过夜。加入 10 μ l DNAase I、10 μ l DNAase I buffer (1 U/ μ l) 和 100 μ l 无 RNA 酶水, 37°C

孵育 1 h。经 RNA 提取液和氯仿抽提，乙醇沉淀后，加入 20 μ l 无 RNA 酶水溶解。分光光度计检测浓度，1%琼脂糖凝胶电泳检测 *dsRNA* 纯度。

2.2.2.6 细胞系 RNA 干扰

六孔板中转染过表达质粒 24 h 后，将 2 μ g *dsRNA* 和 8-10 μ l 的转染试剂与 200 μ l 无菌的 0.9%生理盐水混合，静置一段时间后，加入 Grace 培养基（含 1%胎牛血清）中。27 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后，加入 20E（终浓度为 2 μ M）诱导 1 h，等量的 DMSO 作为对照，提取 RNA 进行 qRT-PCR 检测干扰效率，纯化蛋白检测翻译后修饰。

2.2.2.7 细胞 RNA 提取

弃培养基，加入 1 \times DPBS 洗涤。每孔加入 1 ml TRIzol，置于冰上裂解 10 min。几次吹吸后，将悬浮液转移至无 RNA 酶的 EP 管中，室温静置 5 min。加入 200 μ l 氯仿剧烈震荡 15 s，室温静置 2 min，4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 min 取上清加入等体积异丙醇，混匀后室温静置 10 min，4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 min，沉淀即为所得 RNA。用焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水配的 75%无水乙醇洗涤沉淀，风干，加入 20 μ l DEPC 水 60 $^{\circ}$ C 溶解 10 min，用分光光度计测定浓度，-80 $^{\circ}$ C 保存或立即反转成 cDNA。

2.2.2.8 cDNA 合成

按照反转录试剂盒说明，在无 RNase 的 EP 管中加入 2 μ g RNA，2 μ l AccuRT Reaction MiX (4 \times)，Water-RNase-free 补充至总体积为 8 μ l 并混匀，42 $^{\circ}$ C 静置 2 min，加入 4 μ l AccuRT Reaction Stopper (5 \times)、6 μ l Water-RNase-free 的水并混匀，25 $^{\circ}$ C 静置 10 min，42 $^{\circ}$ C 静置 20 min，85 $^{\circ}$ C 静置 5 min 终止反应，冰上冷却后得到 cDNA，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.2.9 qRT-PCR (实时荧光定量 PCR)

将反转录得到的 cDNA 用灭菌水稀释 10 倍，引物稀释 100 倍，配制 10 μ l 的反应体系：5 μ l 2 \times SYBR real-time PCR pre-mixture，1 μ l 引物，1 μ l cDNA 模板，3 μ l 灭菌水，全程避光。混匀后放入 qRT-PCR 仪中进行反应，反应程序为：95 $^{\circ}$ C 15min，95 $^{\circ}$ C 15s，60 $^{\circ}$ C 1 min，78 $^{\circ}$ C 读板 2 s，循环 40 次，65 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C 分析溶解曲线，间隔 0.5 s。以 β -Actin 作为内参，三次重复，结果导出后用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析 [118]，双尾 Student's *t*-test 检验差异显著性。

2.2.2.10 Ni²⁺柱纯化细胞蛋白

将六孔板中的培养基吸走，加入 1 ml 无菌的 1 \times DPBS 慢慢摇晃洗净残留。每孔加入 200 μ l 含有 1%蛋白酶抑制剂混合物和 1%磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 细胞裂解液，用刮刀轻轻将细胞刮下，于 4 $^{\circ}$ C 四维摇床旋转裂解 40 min。期间，取约 70 μ l 镍柱，加入 Lysis buffer 活化，于 4 $^{\circ}$ C 四维摇床旋转 5 min 后，4 $^{\circ}$ C 3000

rpm 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次。细胞蛋白裂解完成后, 4°C 12000 rpm 离心 15 min。将上清移至含有镍柱的 EP 管中, 于 4°C 四维摇床旋转孵育 40 min。结束后, 4°C 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。加入 Wash buffer 洗去非特异性吸附, 于 4°C 四维摇床旋转 5 min 后, 4°C 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次。完成后, 加入 40 μ l Elution buffer, 与柱料轻轻混合后, 加入 20 μ l 蛋白处理液, 100°C 煮 10 min, 得到目的蛋白。

2.2.2.11 免疫共沉淀 (Co-IP)

将过表达质粒 USP1-His、MET1-RFP-His 和 ECR-GFP-His 共转染到密度为 80% 左右的 HaEpi 细胞中。24 h 后, 每孔转染 2 μ g *dsOga*, 同时转染等量的 *dsGfp* 作为对照。48 h 后, 将细胞与 20E (终浓度为 2 μ M) 或 DMSO 孵育。用无菌的 DPBS 洗净培养基, 每孔加入 200 μ l 含有 1% 蛋白酶抑制剂混合物和 1% 磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 细胞裂解液, 用刮刀轻轻将细胞刮下, 于 4°C 四维摇床旋转裂解 40 min。之后的操作步骤同免疫沉淀。

2.2.2.12 兔源多克隆抗体的制备

2.2.2.12.1 重组表达载体的构建

设计原核表达引物 anti-ACAT1 (F) 和 anti-ACAT1 (R), 以棉铃虫脂肪体组织 cDNA 为模板, 使用 HiFi 酶扩增 ACAT1 的 149-266 位置的氨基酸序列。PCR 结束后, 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中检测目的条带。将含有目的条带的 PCR 产物进行抽提, 抽提得到的 DNA 片段与 pET-32a 质粒在 37°C 酶切 1.5 h。1% 琼脂糖凝胶电泳回收酶切产物, 测定浓度后利用 T4 DNA 连接酶在 16°C 连接过夜。次日, 将连接产物与大肠杆菌 DH5 α 于冰上混匀, 静置 30 min, 然后, 42°C 热击 75 s, 加入 1 ml LB 培养基, 37°C 摇床培养 1 h。常温离心收集菌体, 涂布至含有氨苄 (125 μ g/mL) 的固体培养基上, 37°C 烘箱培养 14-16 h。选取单菌落进行 PCR 筛选, 阳性菌落于 -80°C 保存。

表 2-1 质粒酶切体系

Tab. 2-1 Plasmid digestion system

酶切体系	
内切酶 1	1 μ l
内切酶 2	1 μ l
10 \times Fast Digestion Buffer	2 μ l
质粒/片段	2 μ g
ddH ₂ O	补至 20 μ l

表 2-2 质粒连接体系

Tab. 2-2 Plasmid ligation system

连接体系	
10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
质粒	100 ng
片段	300 ng
ddH ₂ O	补至 20 μl

2.2.2.12.2 重组蛋白的表达及纯化

将重组质粒转入大肠杆菌 Rosetta 菌株表达目的蛋白，并以 1:100 的比例扩大培养至 300 ml（氨苄浓度为 125 μg/ml）的 LB 培养基中。37°C 摇床培养至 OD=0.4 时，加入 IPTG（终浓度为 0.01 mM）培养过夜。收集菌体，于冰上进行超声破碎，常温 8000 rpm 离心 5 min，收集上清进行 His 柱纯化，SDS-PAGE 检测目的蛋白。0.3 M 的 CuCl₂ 染凝胶，切下目的条带，研磨。

2.2.2.12.3 多克隆抗体制备

将得到的凝胶与等量的完全佐剂充分混合，注射于兔子皮下，1 周后取血验证。3 周后，将蛋白与等量不完全佐剂充分混合再次注射，1 周后再取血。2 周后，再次注射蛋白与等量不完全佐剂混合物，间隔一周后取血，检测抗体效价。

2.2.2.13 虫体 RNA 干扰

选取 60 只 6th-6h 的棉铃虫幼虫，随机平均分为两组。一组注射 *dsRNA*（用无菌的 PBS 稀释至浓度为 400 ng/μl），每只虫注射 2 μg，另一组注射等量的 *dsGfp* 作为对照。分别在 24 h 和 48 h 后再次注射，注射三针后，选取 3 只棉铃虫提取 RNA 检测干扰效率。观察记录并统计两组棉铃虫的表型。

2.2.2.14 虫体 RNA 提取

在无 RNase 的 EP 管中加入 500 μl TransZol，冰上预冷。分离虫体的背部表皮、中肠和脂肪体放入 EP 管中，电动组织匀浆器充分研磨，再加入 500 μl TransZol 充分浸润组织，4°C 12000 rpm 离心 15 min，转移上清至另一 EP 管，之后的操作与细胞 RNA 提取步骤相同。

2.2.2.15 统计方法

本论文中实验至少重复三次。误差线表示三次实验平均值 ± SD。利用 Image J 软件分析蛋白质免疫印迹条带灰度值，利用 GraphPad Prism 8 (version 8.0.2) 采用双尾 *Student's t-test* 方法对数据进行差异分析 (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001)。

表 2-3 所用引物序列

Tab. 2-3 Sequences primers used in this study

Primer's name	(5'-3') nucleotide sequence
Primers for quantitative Real-time PCR	
<i>β-Actin</i> -RTF	cctggtattgctgaccgtatgc
<i>β-Actin</i> -RTR	ctgttgaaggtggagagggaa
<i>Oga</i> -RTF	cccaactgcgagtacaac
<i>Oga</i> -RTR	gagcgggtgcttcatctca
<i>Ep300</i> -RTF	agttgatgggaggtgcttgg
<i>Ep300</i> -RTR	ttgagctgttgctgttggga
<i>Kat2a</i> -RTF	acgcaggcagaaggagattg
<i>Kat2a</i> -RTR	cggtgacagatcgacggttg
<i>Kat5</i> -RTF	acaggtgtattgccggaga
<i>Kat5</i> -RTR	gcttgggttcctgtaatgaattg
<i>Acat1</i> -qRTF	ctgaacatctcaaggaaggaaca
<i>Acat1</i> -qRTR	tggggcagcacctctctc
<i>Usp1</i> -RTF	ggtcctgacagcaatgt
<i>Usp1</i> -RTR	ttccagctccagctgactgaag
<i>Ecr</i> -RTF	aattgcccgtcagtacga
<i>Ecr</i> -RTR	tgagcttctcattgagga
<i>Br-z7</i> -RTF	atggctgatcaattctgttta
<i>Br-z7</i> -RTR	gttcggtgaagagaaatttc
Primers for the synthesis of double-stranded RNA	
<i>dsOga</i> -F	taatacgactcactatgggttcatttgcgggtgttgtg
<i>dsOga</i> -R	taatacgactcactatagggctcttctatcgcttctgttgt
<i>dsEp300</i> -F	gcgtaatacgactcactatagggcagggtctctgtgtgataattg
<i>dsEp300</i> -R	gcgtaatacgactcactatagggaaaatctcgtgtagacggcagt
<i>dsKat2a</i> -F	gcgtaatacgactcactatagggcttgacctcgtgacgagt
<i>dsKat2a</i> -R	gcgtaatacgactcactataggggtcgtggttctttaccgcat
<i>dsKat5</i> -F	gcgtaatacgactcactatagggcaccacaccgaagaagaca
<i>dsKat5</i> -R	gcgtaatacgactcactatagggcttgggttcctgtaatgaattgt
<i>dsAcat1</i> -F	gcgtaatacgactcactatagggacctcattggcaactgtg
<i>dsAcat1</i> -R	gcgtaatacgactcactataggggtacaccctttcgcct
Primers for expression	
<i>Acat1</i> -F	tactcaggatccgaatctatgtcaaacgtgcct
<i>Acat1</i> -R	tactcactcaggtttacacagttgccaatgaggtaa
Primers for overexpression	
<i>Acat1</i> -OEF	tactcagagctcatgtttttttaaaggcaataga
<i>Acat1</i> -OER	tactcaagatctgcaattttcaatcatgatagatgtg

2.3 实验结果

2.3.1 取食期与变态期 USP1 翻译后修饰状态的变化

幼虫自孵化以来，需经历五次蜕皮到达 6 龄幼虫。进入 6 龄后，前 48 小时为取食期，从 72 小时开始不吃少动，进入变态期。用 6 龄取食期（6F）作为对照，检测 6 龄变态期（6M）USP1 翻译后修饰的变化，比较翻译后修饰状态的异同。分别提取 6F 和 6M 的总蛋白，通过免疫沉淀纯化出 USP1，检测 USP1 在取食期和变态期 *O*-GlcNAc 修饰、磷酸化和乙酰化三种修饰状态的变化。Western blot 结果表明，在 6 龄幼虫取食期，USP1 主要以 *O*-GlcNAc 修饰状态存在，而进入变态期后，*O*-GlcNAc 修饰减少，磷酸化和乙酰化增多（图 2-1），说明 USP1 在变态发育前后以不同的翻译后修饰状态存在：取食期以 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 为主，变态期以磷酸化和乙酰化的 USP1 为主。

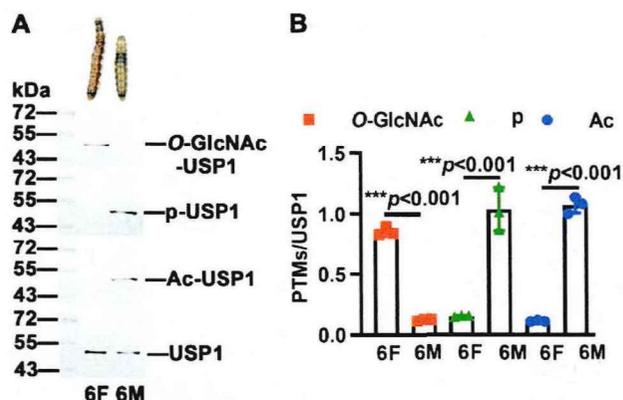


图 2-1 6 龄取食期和 6 龄变态期 USP1 翻译后修饰的变化

Fig. 2-1 Changes in PTMs of USP1 at 6F and 6M

注：(A) 取棉铃虫取食期和变态期总蛋白，免疫沉淀得到 USP1，Western blot 检测翻译后修饰变化。*O*-GlcNAc-USP1：*O* 位 N 乙酰葡萄糖胺修饰的 USP1，p-USP1：磷酸化修饰的 USP1，Ac-USP1：乙酰化修饰的 USP1。SDS-PAGE 胶浓度是 10%。(B) Image J 统计 USP1 翻译后修饰的蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。误差线表示三次实验平均值 ±SD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

Notes: (A) USP1 was obtained by immunoprecipitation from total proteins at feeding and metamorphosis stages of *Helicoverpa armigera*. Post-translational modifications were detected by Western blot. *O*-GlcNAc-USP1: *O*-GlcNAcylated USP1, p-USP1: phosphorylated USP1, Ac-USP1: acetylated USP1. SDS-PAGE glue concentration is 10%. (B) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of post-translational modified USP1 to the protein bands of purified USP1. The error line represents the mean ±SD of the three experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.3.2 20E 通过 OGA 促进 USP1 第 21 位丝氨酸去除 O-GlcNAc 修饰, 继而发生磷酸化

既然 USP1 上可以发生 O-GlcNAc 修饰、磷酸化和乙酰化等多种修饰, 那么它们之间是否有关联呢? 考虑到 O-GlcNAcylation 和磷酸化都修饰丝氨酸残基, 且在变态前后, 二者存在一种“此消彼长”的趋势, 所以首先探究 O-GlcNAcylation 和磷酸化之间的关系。本实验室前期工作已证明 USP1 的磷酸化发生在第 21 位丝氨酸。在 HaEpi 中过表达 USP1-His 以及 USP1-S21A-His (第 21 位丝氨酸突变为丙氨酸), 并模拟变态时期 20E 滴度升高的状态, 用 20E 处理细胞, 检测 O-GlcNAcylation 和磷酸化修饰的变化。免疫印迹结果表明, 在过表达野生型 USP1 的细胞中, 与 DMSO 对照组相比, 20E 处理能够在 1 h 内增强 HaEpi 细胞系中 USP1 的磷酸化水平, 同时降低 USP1 的 O-GlcNAcylation 水平(图 2-2A 泳道 1、2)。将负责去除 O-GlcNAcylation 修饰的糖苷酶 *Oga* 敲降, USP1 维持 O-GlcNAcylation 修饰, 此时 20E 诱导后磷酸化无法发生(图 2-2A 泳道 3、4)。将 21 位丝氨酸突变为丙氨酸后, O-GlcNAcylation 和磷酸化水平均降低, 且 20E 处理和敲降 *Oga* 后均无变化(图 2-2A 泳道 5-8)。以上结果说明, O-GlcNAc 修饰和磷酸化修饰均发生在第 21 位丝氨酸, 20E 可促使 O-GlcNAc 修饰去除和磷酸化的发生, 其中 O-GlcNAcylation 修饰去除是由糖苷酶 OGA 负责的。

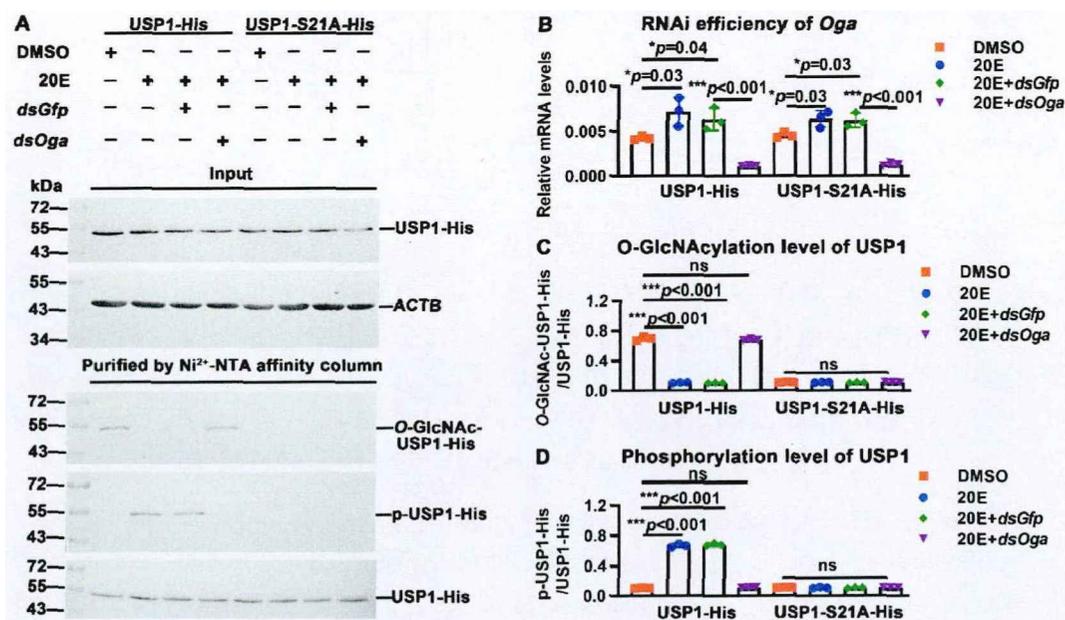


图 2-2 20E 通过 OGA 促进 USP1 第 21 位丝氨酸去除 O-GlcNAc 修饰, 继而发生磷酸化

Fig. 2-2 20E down-regulated the O-GlcNAcylation level of USP1 through OGA, and serine 21 was the modification site of O-GlcNAcylation and phosphorylation

注: (A) 免疫印迹检测 USP1 的 O-GlcNAcylation 和磷酸化的变化。在 HaEpi 中过表达

USP1-His 和 USP1-S21A-His, 24 h 后转染 *dsOga* 和对照组 *dsGfp*。48 h 后, 使用终浓度为 2 μ M 的 20E 诱导 1 h, 相同剂量的 DMSO 作为 20E 的溶剂对照。Input: 使用 His 标签抗体和 ACTB 抗体检测 USP1-His 和 ACTB 的表达水平。Ni²⁺-NTA 纯化过表达的 USP1-His, 用 His 标签抗体检测 USP1, 分别用 *O*-GlcNAcylation 抗体和丝氨酸多克隆抗体检测 USP1 的 *O*-GlcNAcylation 和磷酸化修饰水平。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。(B) 统计 *Oga* 干扰效率。细胞转染 *dsOga* 和 *dsGfp* 48 h 后提取细胞 RNA 反转录为 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测干扰效率。(C) (D) 使用 Image J 统计 USP1 翻译后修饰的蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。

Notes: (A) Western blotting was used to detect the changes of *O*-GlcNAcylation and phosphorylation in USP1. USP1-His and USP1-S21A-His were overexpressed in HaEpi, and *dsOga* and *dsGfp* were transfected 24 h later. After 48 h, 20E with a final concentration of 2 μ M was used to induce for 1 h, and the same dose of DMSO was used as the solvent control for 20E. Input: Use His labeled antibody and ACTB antibody for Western blot detection of USP1-His and ACTB expression levels in experimental cells. After purification of overexpressed USP1-His by Ni²⁺-NTA, USP1 was detected by His labeled antibody, and *O*-GlcNAcylation and phosphorylation levels of USP1 were detected by *O*-GlcNAcylation and serine polyclonal antibody, respectively. The concentration of SDS-PAGE gel is 10%. (B) Statistical *Oga* interference efficiency. After transfection with *dsOga* and *dsGfp* 48 h, cell RNA was extracted and reverse-transcribed into cDNA, and RNAi efficiency was detected by qRT-PCR. (C) (D) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of post-translational modified USP1 to the protein bands of purified USP1.

2.3.3 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合, 磷酸化的 USP1 与 ECR 结合

那么不同的翻译后修饰的 USP1 是否对应分别与 MET1 和 ECR 的结合呢? 在棉铃虫表皮细胞系中分别表达 USP1-His、MET1-RFP-His 和 ECR-GFP-His, 在 DMSO 和 20E 两种条件下, 检测 USP1 与 MET1 和 ECR 的结合情况。实验结果表明, 在 DMSO 对照组中, 过表达的 USP1 带有 *O*-GlcNAc 修饰, 可与 MET1 结合(图 2-3A 泳道 1), 20E 诱导 USP1 发生磷酸化, 磷酸化修饰的 USP1 可与 ECR 结合(图 2-3A 泳道 2)。敲降 *Oga* 维持 USP1 的 *O*-GlcNAc 修饰, 20E 无法诱导磷酸化发生, 维持 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 仍与 MET1 结合而无法结合 ECR (图 2-3A 泳道 3、4)。这些结果说明, *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合, 磷酸化的 USP1 与 ECR 结合。

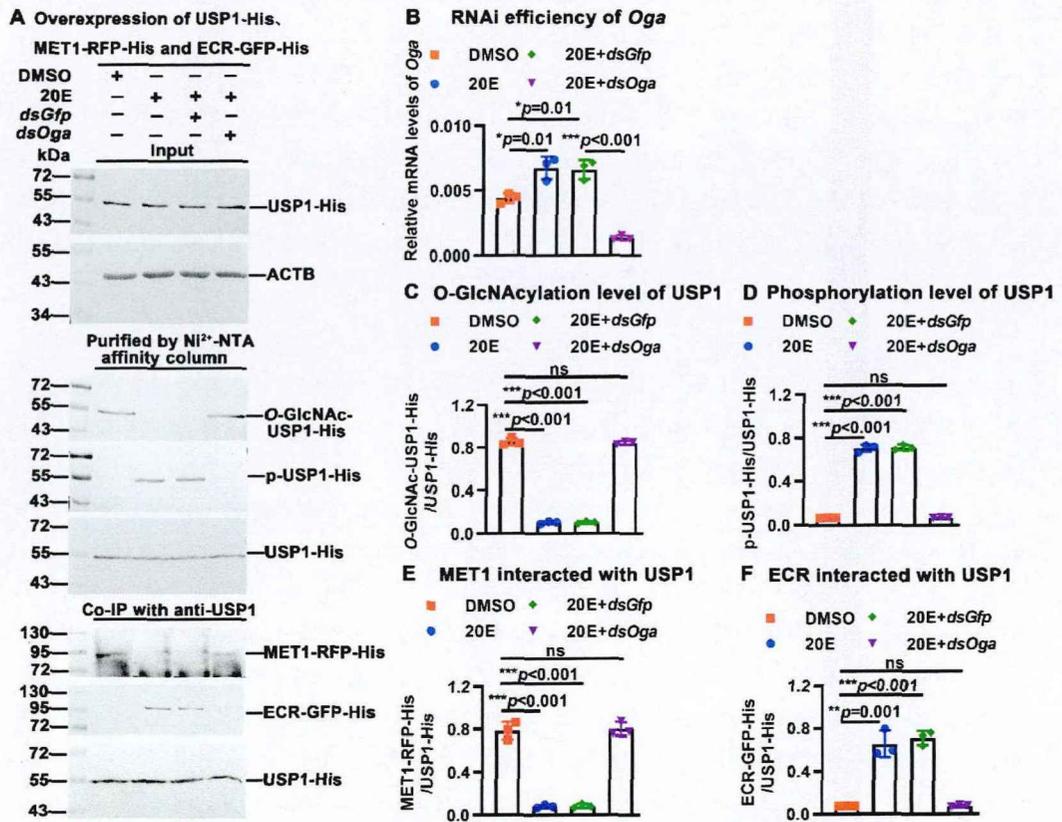


图 2-3 O-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 相互作用的检测

Fig. 2-3 Detection of interaction between O-GlcNAcylated USP1 and MET1

注：(A) 在 HaEpi 中过表达 USP1-His、MET1-RFP-His 和 ECR-GFP-His，24 h 后转染 *dsOga* 和对照组 *dsGfp*。48 h 后使用终浓度为 2 μ M 的 20E 诱导 1 h，相同剂量的 DMSO 作为 20E 的溶剂对照。用 RFP 标签抗体检测 MET1，用 GFP 标签抗体检测 ECR，用 USP1 抗体检测 USP1，SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。(B) 统计 *Oga* 干扰效率。(C) (D) Image J 统计 USP1 翻译后修饰的蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。(E) (F) Image J 统计 MET1 和 ECR 的蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。

Notes: (A) USP1-His, MET1-RFP-His and ECR-GFP-His were overexpressed in HaEpi, and *dsOga* and *dsGfp* were transfected 24 h later. Finally, 20E with a final concentration of 2 μ M was used to induce for 1 h, and the same dose of DMSO was used as the solvent control for 20E. Detection of MET1 by anti-RFP label antibody, detection of ECR by anti-GFP label antibody, detection of USP1 by anti-USP1 antibody. The concentration of gel is 10%. (B) Statistical *Oga* interference efficiency. (C) (D) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of post-translational modified USP1 to the protein bands of purified USP1. (E) (F) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of MET1 and ECR to the protein bands of purified USP1.

2.3.4 USP1 的磷酸化与乙酰化互不影响

USP1 的磷酸化和乙酰化均可以介导与 ECR 的结合[38, 40], 那么这两种修饰之间有无关联呢? 在棉铃虫表皮细胞系中过表达野生型 USP1-His、突变磷酸化修饰位点的 USP1-S21A-His 和突变乙酰化修饰位点的 USP1-K303R-His, 检测 20E 处理对磷酸化和乙酰化的影响。结果表明, 与 DMSO 处理组相比, 20E 处理可诱导 USP1 磷酸化和乙酰化修饰程度升高 (图 2-4 泳道 1、2)。第 21 位丝氨酸突变后, 20E 不能再上调磷酸化水平, 但乙酰化水平正常升高, 与对照组相同 (图 2-4 泳道 3、4)。第 303 位赖氨酸突变后, 20E 不能再上调乙酰化水平, 但磷酸化水平正常升高 (图 2-4 泳道 5、6)。这说明, USP1 的磷酸化与乙酰化互不影响。

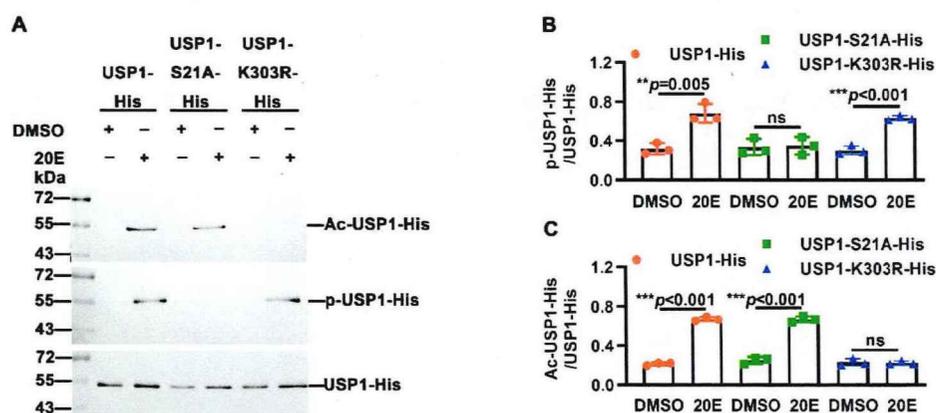


图 2-4 USP1 的磷酸化与乙酰化互不影响

Fig. 2-4 Phosphorylation and acetylation of USP1 were independent of each other

注: (A) 20E 刺激检测 USP1 磷酸化与乙酰化。在 HaEpi 细胞系中过表达 USP1-His、USP1-S21A-His 和 USP1-K303R-His, 48 h 后使用终浓度为 2 μ M 的 20E 诱导 1 h, 相同剂量的 DMSO 作为 20E 的溶剂对照。经过 Ni^{2+} -NTA 纯化过表达的 USP1-His 之后, 分别用 His 标签抗体检测 USP1, 丝氨酸磷酸化抗体检测磷酸化, 泛乙酰化抗体检测乙酰化, SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。(B) (C) Image J 统计 USP1 翻译后修饰的蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。

Notes: (A) Detect phosphorylation and acetylation of USP1 by 20E stimulation. USP1-His, USP1-S21A-His and USP1-K303R-His were overexpressed in HaEpi. After 48 h induction, 20E with a final concentration of 2 μ M was used for 1 h, and the same dose of DMSO was used as the solvent control for 20E. After purification of overexpressed USP1-His by Ni^{2+} -NTA, USP1 was detected by His labeled antibody, phosphorylation by serine phosphorylation antibody, and acetylation by panacetylation antibody. SDS-PAGE gel concentration was 10%. (B) (C) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of post-translational modified USP1 to the protein bands of purified USP1.

2.3.5 ACAT1 负责 USP1 的乙酰化

已知 USP1 的磷酸化由 PKC 调控[38, 39], 那么负责 USP1 乙酰化的酶是谁呢? 为了探寻这一问题的答案, 通过网站 (<http://csspalm.biocuckoo.org/>) 在 CREBBP、EP300、HAT1、KAT2A、KAT2B、KAT5、KAT8 中预测使 USP1 发生乙酰化的酶, 将其中评分较高的 EP300、KAT2A、KAT5 和 ACAT1 一起在棉铃虫表皮细胞系上进行 RNAi 实验, 结果表明, 与其他乙酰转移酶相比, 干扰 ACAT1 对 USP1 乙酰化影响最显著 (图 2-5A-C), 说明 ACAT1 可能是负责 USP1 乙酰化的酶。虫体 RNAi 结果表明, 敲降 *Acat1*, 幼虫出现化蛹延迟的表型, 平均化蛹时间延迟约 24 h (图 2-6B-D)。检测 20E 信号途径下游基因 *Ecr*、*Usp1* 和 *Br-z7* 的表达, 发现这三种基因的表达均受到抑制 (图 2-6E)。检查中肠与脂肪体形态变化, 发现对照组 6th-72 h 时幼虫的中肠已经变红, 而实验组幼虫中肠未变红; 对照组 6th-120 h 时的幼虫中肠开始降解, 而实验组幼虫中肠仍然完整 (图 2-6F)。对中肠和脂肪体进行 HE 染色, 分析发现对照组 6th-72 h 时成虫中肠已经形成, 而实验组幼虫中肠未形成; 对照组 6th-120 h 时的成虫中肠与幼虫中肠完全分离, 而实验组成虫中肠尚未形成。对照组 6th-72 h 时幼虫脂肪体已经开始弥散, 而实验组幼虫脂肪体仍然完整; 对照组 6th-120 h 时的脂肪体更加弥散, 而实验组幼虫脂肪体刚开始弥散 (图 2-6G)。Western blot 检测发现, USP1 的乙酰化水平下降 (图 2-6H)。以上结果说明, 敲降 *Acat1* 抑制了 USP1 的乙酰化, 进而抑制了 20E 信号转导途径从而抑制了变态发育, 证实了 ACAT1 负责 USP1 乙酰化的结论。

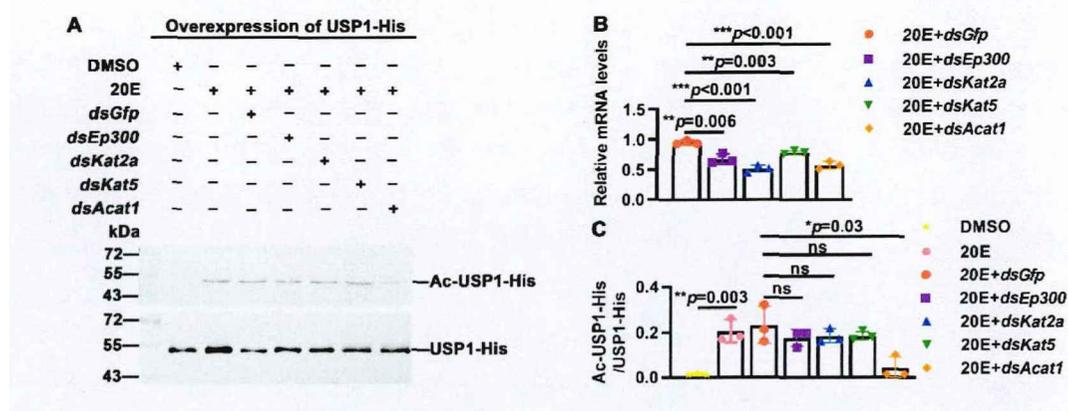


图 2-5 使 USP1 发生乙酰化的酶的筛选

Fig. 2-5 Screening of the enzyme that acetylates USP1

注: (A) 干扰多种乙酰化酶检测 USP1 乙酰化变化。(B) 统计乙酰化酶的干扰效率。(C) Image J 统计乙酰化的 USP1 蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。

Notes: (A) Interference with a variety of acetylases to detect USP1 acetylation changes. (B) Statistical RNAi efficiency. (C) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of acetylated USP1 to the protein bands of purified USP1. (D) *Acat1* knockdown was performed by *dsRNA* injection at 6th-6 h, once every 24 h, 3 times in total. 24 h after the third injection, RNA was extracted, reverse-transcribed into cDNA, and RNAi efficiency was detected by qRT-PCR. (E) Total protein was extracted after the interference was completed, after immunoprecipitation, the acetylation of USP1 was detected by Western blot. (F) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of acetylated USP1 to the protein bands of purified USP1. SDS-PAGE gel concentration was 10%.

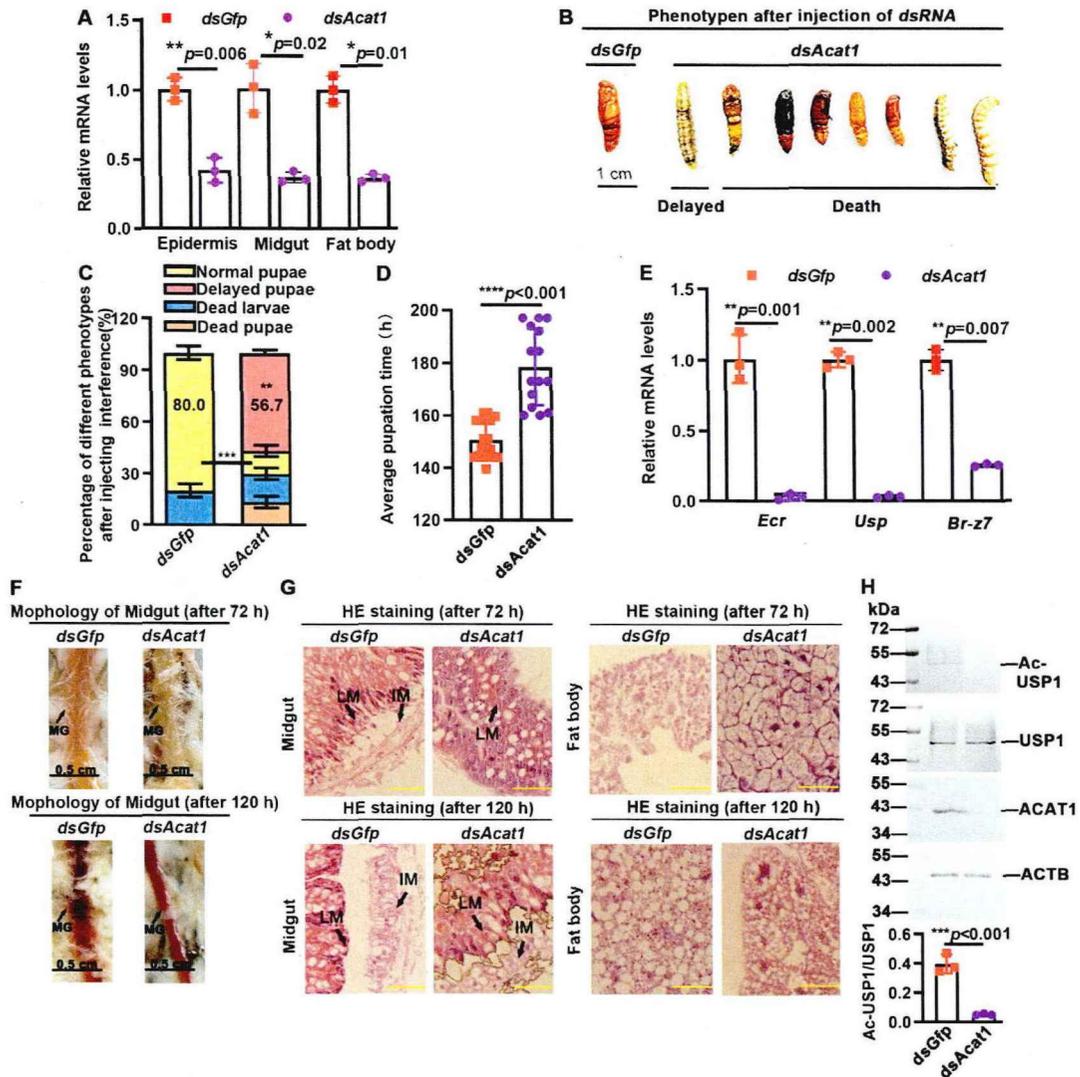


图 2-6 虫体敲降 *Acat1* 后 USP1 乙酰化的检测

Fig. 2-6 Detection of USP1 acetylation after *Acat1* knockdown

注：(A) 统计 *Acat1* 干扰效率。于 6th-6 h 对幼虫注射 *dsAcat1*，每次注射 2 μ g，每隔 24 h 注射 1 次，共注射 3 次。*dsGfp* 作为 *dsAcat1* 的非特异性干扰。注射完成后的 12 h 后随机

选取 3-5 只幼虫提取 RNA 反转录为 cDNA 后 qRT-PCR 检测干扰效率。(B) 敲降 *Acat1* 后在蛹期的表型。(C) 统计 (B) 中的表型。(D) 统计化蛹时间。(E) 统计 20E 下游基因的表达。敲降 *Acat1* 后, 于 6th-120 h 时提取 RNA 反转录为 cRNA 用于 qRT-PCR 检测 20E 下游基因的表达。(F) 敲降 *Acat1* 后, 6th-72 h 和 6th-120 h 幼虫的解剖图。(G) 敲降 *Acat1* 后, 6th-72 h 和 6th-120 h 时幼虫中肠和脂肪体的 HE 染色。统计数 ≥ 30 只。(H) 敲降 *Acat1* 后提取总蛋白, 免疫沉淀后, Western blot 检测 USP1 乙酰化变化。Image J 统计 ACAT1 蛋白条带与 ACTB 蛋白条带的比值, 乙酰化的 USP1 蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。

Notes: (A) Calculate the interference efficiency of *Acat1*. Larvae were injected with *dsAcat1* at 6th-6 h, 2 μg each time, once every 24 h, for 3 times in total. *dsGfp* as a nonspecific interference of *dsAcat1*. 12 h after injection, 3-5 larvae were randomly selected to extract RNA and reverse transcribed into cDNA, then qRT-PCR was used to detect interference efficiency. (B) Phenotype in pupal stage after *Acat1* knockdown. (C) Statistical phenotypes in (B). (D) Counting the pupation time. (E) The expression of 20E downstream genes was analyzed. After knockdown of *Acat1*, RNA was extracted at 6th-120 h for reverse transcription into cRNA for qRT-PCR to detect the expression of 20E downstream genes. (F) Anatomic maps of larvae 6th-72 h and 6th-120 h after *Acat1* knockdown. (G) HE staining of larval midgut and fat body at 6th-72 h and 6th-120 h after knockdown of *Acat1*. Statistical number ≥ 30 . (H) Total protein was extracted after *Acat1* knockdown, and the acetylation of USP1 was detected by Western blot after immunoprecipitation.

Image J calculated the ratio of ACAT1 protein bands to ACTB protein bands and the ratio of acetylated USP1 protein bands to purified USP1 protein bands.

2.3.6 ACAT1 的转乙酰基功能受到琥珀酰化的调节

那么, ACAT1 使 USP1 去乙酰化的机制是什么呢? 带着这个问题, 在棉铃虫基因组中进行 BLAST, 通过建立进化树分析, 发现棉铃虫基因组中只有一个 ACAT1。该基因 ORF 全长 1656 bp, 拟编码 423 个氨基酸, 经过 ExPASy 计算该肽链分子量为: 45 kDa, 等电点为 8.93。SMART 结构分析发现有 3 个结构域。与不同物种的序列进行同源比对发现与家蚕 (*Bombyx mori*)、帝王蝶 (*Danaus plexippus*) 的 ACAT1 序列同源性较高。为了更好的探究 ACAT1 的功能, 制备了一段大小为 32 kDa 的 ACAT1 多肽 (图 2-7A), 随后免疫新西兰大白兔之后得到多克隆抗体。经过 Western blot 检测后, 该抗体可以识别棉铃虫 ACAT1, 且特异性良好, 因此用于后续实验中 (图 2-7B)。为了进一步探究 ACAT1 的作用机制, 对棉铃虫全龄期的背部表皮、中肠和脂肪体组织进行表达模式分析。结果表明, ACAT1 在脂肪体中表达量最高, 但在棉铃虫整个发育阶段表达量无显著变化 (图 2-7C、D)。这提示 ACAT1 功能可能受到翻译后修饰水平的调节。已有文章报道, 人中 ACAT1 可以发生磷酸化修饰, 使 ACAT1 功能更加稳定 [66]。本实验室琥珀酰化组学 (未发表) 发现 ACAT1 可能存在琥珀酰化修饰。对棉铃虫取食期和变

态蜕皮期的 ACAT1 蛋白进行纯化，并通过 Western blot 分析其在取食期和变态期磷酸化水平和琥珀酰化修饰水平的变化。结果表明，ACAT1 在取食期和变态期的磷酸化水平没有变化，但琥珀酰化水平在变态期显著降低（图 2-7D、E）。

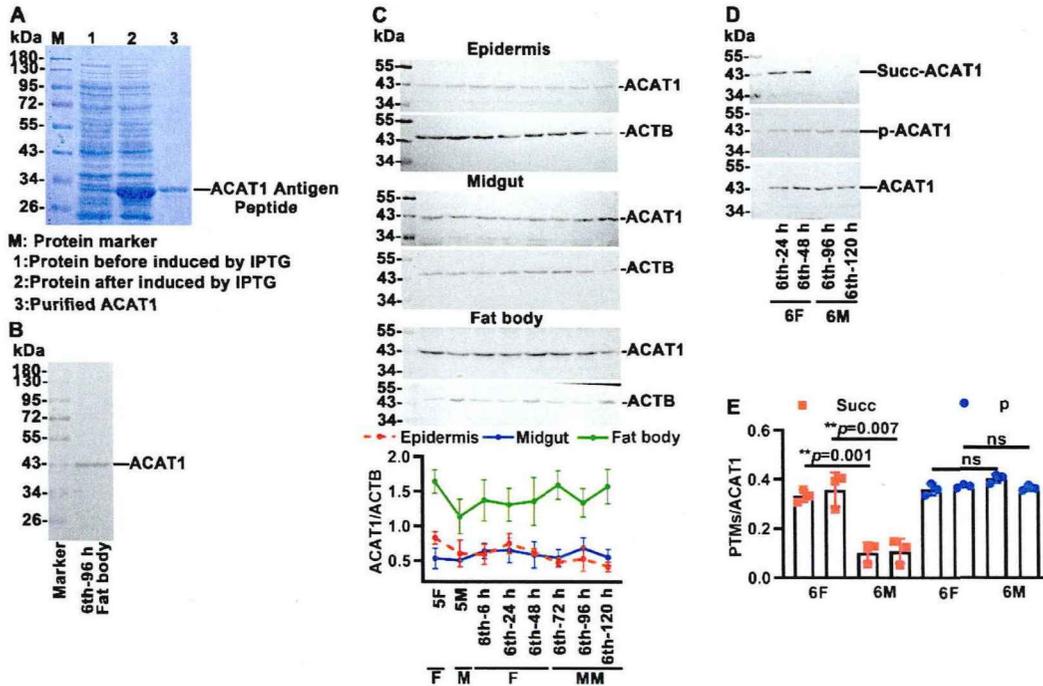


图 2-7 ACAT1 抗体制备、全龄期表达模式分析及取食期与变态期翻译后修饰的变化

Fig. 2-7 Preparation of ACAT1 antibody, full-age expression pattern analysis, and changes of PTMs at 6F and 6M

注：(A) ACAT1 的原核表达及纯化。0.1 mM 的 IPTG 诱导过夜，经镍柱纯化得到产物。(B) 免疫印迹检测 ACAT1 抗体特异性。用 6th-96 h 脂肪体蛋白作为样品。蛋白上样量为 20 μg /孔。(C) ACAT1 在不同组织中的全龄期表达模式。使用 ACTB 作为内参基因。5F：5 龄幼虫取食期；5M：5 龄幼虫蜕皮期；6th-6 h，6th-24 h，6th-48 h，6th-72 h，6th-96 h 和 6th-120 h 表示不同发育阶段的 6 龄幼虫。F：取食期；M：蜕皮期；MM：变态蜕皮期。Image J 统计 ACAT1 蛋白条带与 ACTB 蛋白条带的比值。(D) 取 6th-6 h 和 6th-24 h 作为 6F 样品，6th-96 h 和 6th-120 h 作为 6M 样品，经免疫沉淀，利用 Western blot 检测 ACAT1 的酪氨酸磷酸化和琥珀酰化。(E) Image J 统计酪氨酸磷酸化和琥珀酰化的 ACAT1 蛋白条带与纯化的 ACAT1 蛋白条带的比值。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。

Notes: (A) Prokaryotic expression and purification of ACAT1. 0.1 mM IPTG was induced overnight and the product was purified by Ni^{2+} column. (B) Western blot was used to detect the specificity of ACAT1 antibody. 6th-96 h fat body protein was used as sample. The loading amount of protein was 20 μg / well. (C) Whole-age expression patterns of ACAT1 in different tissues. Use ACTB as the internal reference gene. 5F: feeding stage of 5th instar; 5M: molting stage of 5th instar larvae; 6th-6 h, 6th-24 h, 6th-48 h, 6th-72 h, 6th-96 h and 6th-120 h represent the 6th instar

larvae at different developmental stages. F: Feeding period; M: Molting stage; MM: Metamorphosis Molting stage. Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of ACAT1 to the protein bands of ACTB. (D) Samples of 6F were taken at 6th-6 h and 6th-24 h, 6th-96 h and 6th-120 h were used as samples of 6M, after immunoprecipitation, ACAT1 tyrosine phosphorylation and succinylation were detected by Western blot. (E) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of post-translational modified ACAT1 to the protein bands of purified ACAT1. The concentration of SDS-PAGE gel is 10%.

那么，USP1 乙酰化是否受到 ACAT 琥珀酰化修饰状态的影响呢？本实验室琥珀酰化组学（未发表）鉴定到了 ACAT1 的 1 个可能的琥珀酰化位点（K238）。构建 ACAT1 在 HaEpi 中的过表达质粒 ACAT1-RFP-His，并将 ACAT1 第 238 位赖氨酸分别突变为精氨酸（ACAT1-K238R-RFP-His）模拟去琥珀酰化状态，和谷氨酸（ACAT1-K238E-RFP-His）模拟琥珀酰化状态[88, 89]。在 HaEpi 中分别过表达 ACAT1-RFP-His 和 USP1-His、ACAT1-K238R-RFP-His 和 USP1-His、ACAT1-K238E-RFP-His 和 USP1-His，并叠加 20E 刺激检测 USP1 乙酰化变化及 ACAT1 与 USP1 的结合。结果表明，与 DMSO 处理组相比，20E 诱导 ACAT1 去除琥珀酰化，去除琥珀酰化的 ACAT1 与 USP1 结合使 USP1 乙酰化（图 2-8A 泳道 1、2）；将 ACAT1 第 238 位赖氨酸突变为精氨酸后，ACAT1 琥珀酰化水平下降，去琥珀酰化的 ACAT1 与 USP1 结合并使之乙酰化（图 2-8A 泳道 3、4）；将 ACAT1 第 238 位赖氨酸突变为谷氨酸后，ACAT1 琥珀酰化水平下降，但其模拟带有琥珀酰化的电荷状态，使得 ACAT1 无法与 USP1 结合并不能使之乙酰化（图 2-8 泳道 5、6）。这说明 ACAT1 转乙酰基的功能受琥珀酰化的下调，并且 ACAT1 是通过与 USP1 直接结合使其发生乙酰化的。

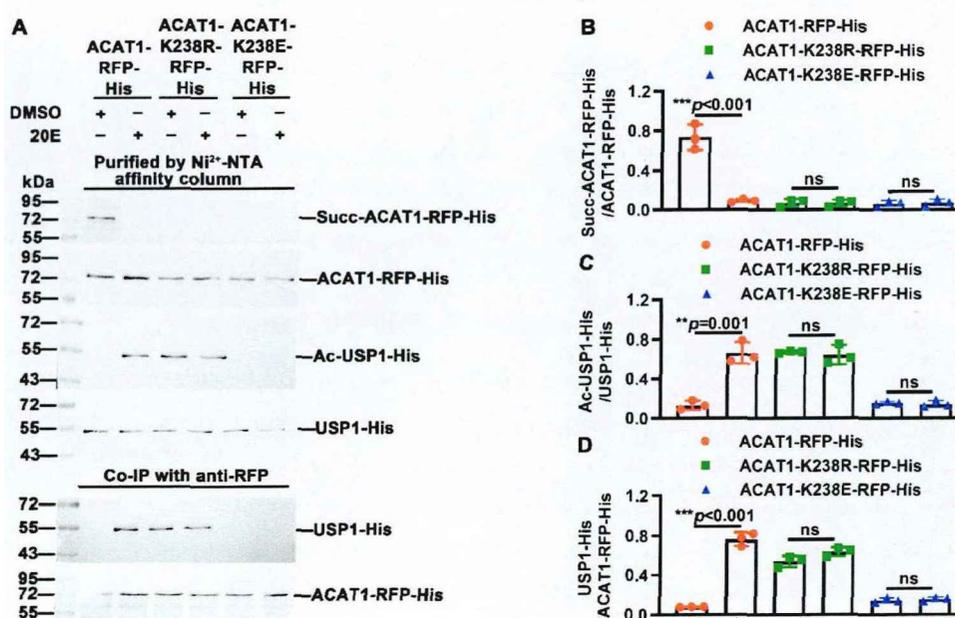


图 2-8 ACAT1 使 USP1 发生乙酰化的方式的检测

Fig. 2-8 Detection of the way in which ACAT1 acetylates USP1

注：(A) 20E 刺激检测 ACAT1 琥珀酰化、USP1 乙酰化及 ACAT1 与 USP1 的结合。在 HaEpi 细胞系中分别过表达 ACAT1-RFP-His 和 USP1-His、ACAT1-K238R-RFP-His 和 USP1-His、ACAT1-K238E-RFP-His 和 USP1-His，48 h 后使用终浓度为 2 μ M 的 20E 诱导 1 h，相同剂量的 DMSO 作为 20E 的溶剂对照。经过 Ni²⁺-NTA 纯化过表达的 ACAT1-RFP-His 和 USP1-His 之后，分别用 ACAT1 抗体检测 ACAT1，His 标签抗体检测 USP1，泛琥珀酰化抗体检测琥珀酰化，泛乙酰化抗体检测乙酰化。Co-IP 检测 ACAT1 与 USP1 的结合。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。(B) Image J 统计琥珀酰化的 ACAT1 蛋白条带与纯化的 ACAT1 的蛋白条带的比值。(C) Image J 统计乙酰化的 USP1 蛋白条带与纯化的 USP1 的蛋白条带的比值。(D) Image J 统计 USP1 蛋白条带与 ACAT1 蛋白条带的比值。

Notes: (A) Detect ACAT1 succinylation, USP1 acetylation and ACAT1 binding to USP1 by 20E stimulation. ACAT1-RFP-His and USP1-His, ACAT1-K238R-RFP-His and USP1-His, ACAT1-K238E-RFP-His and USP1-His were overexpressed in HaEpi, respectively. After 48 h, 20E with a final concentration of 2 μ M was used to induce for 1 h, and the same dose of DMSO was used as the solvent control of 20E. After purification of overexpressed ACAT1-RFP-His and USP1-His by Ni²⁺-NTA, ACAT1 antibody was used to detect ACAT1, His labeled antibody was used to detect USP1, pansuccinylation antibody was used to detect succinylation, and panacetylation antibody was used to detect acetylation. Co-IP detected the combination of ACAT1 and USP1. The concentration of SDS-PAGE glue is 10%. (B) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of succinylated ACAT1 to the protein bands of purified ACAT1. (C) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of acetylated USP1 to the protein bands of purified USP1. (D) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of USP1 to the protein bands of ACAT1.

2.3.7 SIRT5 调控 ACAT1 去琥珀酰化

ACAT1 在幼虫变态期琥珀酰化水平降低，已有文献报道，SIRT5 可以使调控蛋白去琥珀酰化[77]，那么 ACAT1 琥珀酰化的去除是否受 SIRT5 调控呢？为了解决这一问题，在虫体注射 *dsRNA* 敲降 *Sirt5*，三针注射后，提取蛋白检测 SIRT5 的干扰效率，发现 *Sirt5* 被成功敲降（图 2-9 A、C）。利用 Protein-A 纯化，得到的 ACAT1 进行 Western blot 检测，发现敲降 *Sirt5* 后，ACAT1 琥珀酰化水平不再降低（图 2-9A、B）。这说明 ACAT 琥珀酰化的去除由 SIRT5 负责。

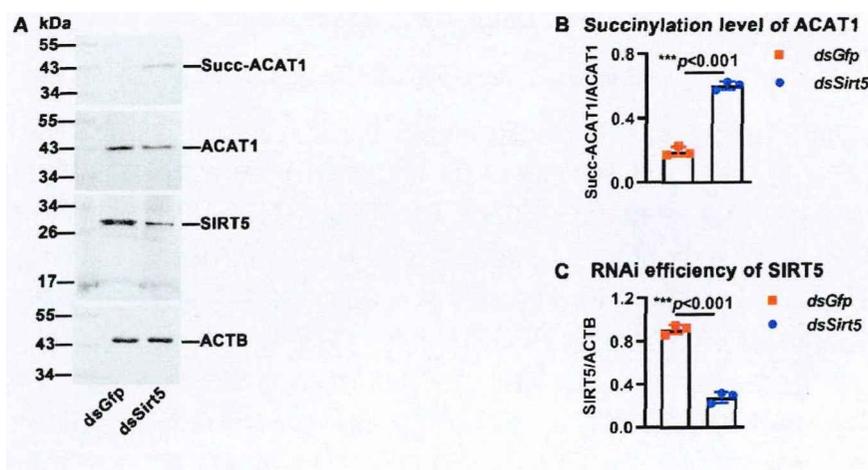


图 2-9 敲降 *Sirt5* 后 ACAT1 琥珀酰化水平的检测

Fig. 2-9 Detection of succinylation level of ACAT1 after *Sirt5* knockdown

注：(A) 敲降 *Sirt5* 检测 ACAT1 琥珀酰化。随机挑取对照组和实验组幼虫各 3 只提取脂肪体蛋白，利用 Western blot 检测 SIRT5 的干扰效率和 ACAT1 的琥珀酰化。分别用 SIRT5 抗体检测 SIRT5，ACAT1 抗体检测 ACAT1，泛琥珀酰化抗体检测琥珀酰化修饰水平。(B) Image J 统计琥珀酰化的 ACAT1 蛋白条带与纯化的 ACAT1 蛋白条带的比值。(C) Image J 统计 SIRT5 的蛋白条带与 ACTB 蛋白条带的比值。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。

Notes: (A) Knockdown *Sirt5* to detect ACAT1 succinylation. Three larvae from the control group and three larvae from the experimental group were randomly selected to extract fat body proteins. The interference efficiency of SIRT5 and succinylation of ACAT1 were detected by Western blot.

SIRT5 antibody was used to detect SIRT5, ACAT1 antibody was used to detect ACAT1, pansuccinylation antibody was used to detect the level of succinylation. (B) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of succinylated ACAT1 to the purified protein bands of ACAT1. (C) Image J was used to calculate the ratio of the protein bands of SIRT5 to the protein bands of ACTB. The concentration of SDS-PAGE gel is 10%.

2.4 讨论

脊椎动物 RXR 通过与不同的受体结合形成二聚体介导不同的信号通路。然而，目前为止，RXR 与不同受体结合的机制还不清楚。在本研究中，利用棉铃虫这一变态发育昆虫，对 RXR 直系同源物 USP1 与 MET1 和 ECR 的结合机制进行研究。研究结果证明，不同翻译后修饰的 USP1 分别与 MET1 和 ECR 结合，即 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合，磷酸化、乙酰化的 USP1 与 ECR 结合，且 *O*-GlcNAc 修饰与磷酸化修饰的关系是此消彼长，磷酸化与乙酰化互不影响。20E 通过上调 OGA 使 USP1 *O*-GlcNAc 修饰水平降低。SIRT5 使 ACAT1 去琥珀酰化，去琥珀酰化的 ACAT1 与 USP1 直接结合使 USP1 乙酰化。

2.4.1 不同翻译后修饰的 USP1 分别与 MET1 和 ECR 结合

RXR 作为激素核受体，主要发挥转录因子的作用，其互作蛋白的多样性有助于信号的转导[5]。已有研究表明，Ser260 磷酸化的 RXR 与受体 VDR 结合减少 [27]，这提示互作蛋白的选择可能与翻译后修饰有关。通过检查 USP1 在取食期和变态期的翻译后修饰状态，发现取食期的 USP1 发生 O-GlcNAc 修饰，变态期的 USP1 发生磷酸化和乙酰化（图 2-1）。在棉铃虫表皮细胞系中检测到 O-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合（图 2-3），磷酸化且乙酰化的 USP1 与 ECR 结合[38]，这些结果表明，带有不同翻译后修饰的 USP1 与不同的激素受体结合介导不同的信号途径，符合预测。

翻译后修饰调节蛋白相互作用的例子有很多。如在促进微管蛋白形成微管（MTs）及神经元的发育过程中发挥重要作用的微管相关蛋白 TAU，其第 262 位丝氨酸的磷酸化破坏了氢键，同时引入静电相互作用，从而减弱 TAU 与 MTs 的结合[119]。还有 RNA 结合蛋白 GEMIN5，第 897 位酪氨酸（T897）发生磷酸化会影响 C 末端螺旋的位置，若将其突变为丙氨酸，会导致 GEMIN5 与调节翻译的蛋白相互作用减少进而导致蛋白翻译水平降低[120]。USP1 第 21 位丝氨酸位于 DNA 结合域，第 303 位赖氨酸位于配体结合域，这两个结构域分别负责 USP1 与 DNA 和配体的结合[121]，这些关键位置的翻译后修饰可能改变了 USP1 的构象和电荷分布，进而调节 USP1 与不同激素受体的相互作用。

通过与其他物种的 RXR 及 RXR 同源物序列比对发现，棉铃虫第 21 位丝氨酸和第 303 位赖氨酸在进化上十分保守（图 2-10），本研究为 RXR 形成异源二聚体的对象选择提供参考。

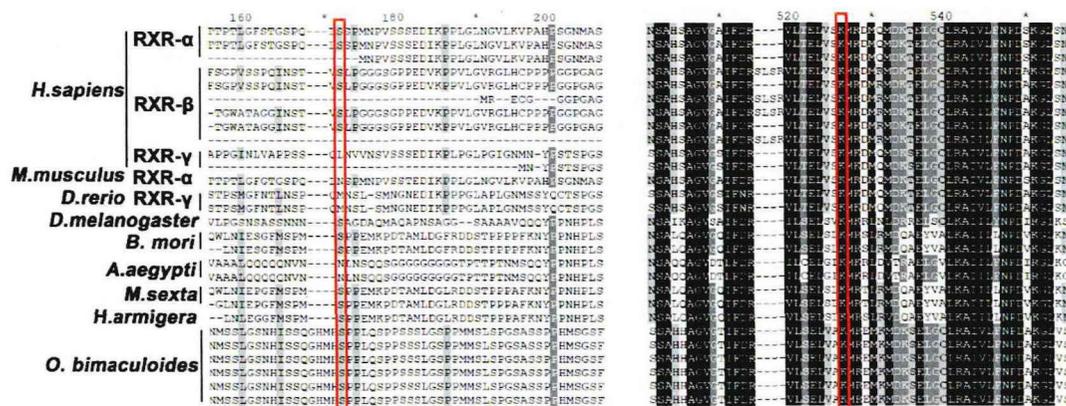


图 2-10 棉铃虫 USP1 第 21 位丝氨酸与第 303 位赖氨酸在不同物种中的进化保守性比对

Fig. 2-10 Comparison of evolutionary conservation of USP1 Ser21 and Lys303 in *H. armigera* in different species

注：底色的深浅代表保守程度，氨基酸序列来源于人、小鼠、斑马鱼、果蝇、家蚕、埃

及伊蚊、烟草天蛾、棉铃虫和章鱼。

Notes: The depth of the background color represents the degree of conservation, and the amino acid sequences are derived from *H.sapiens*, *M.musculus*, *D.rerio*, *D.melanogaster*, *B. mori*, *A. aegypti*, *M.sexta*, *H.armigera* and *O.bimaculoides*.

2.4.2 翻译后修饰调节激素信号转导是细胞生理活动应答外界环境的方式之一

翻译后修饰底物的来源通常是代谢产生的中间产物，与机体的营养状态关系密切，因而也被认为是营养传感器。棉铃虫作为完全变态类昆虫，到达变态期后停止进食，使得体内营养状态发生巨大变化，极有可能伴随着翻译后修饰的改变。

O-GlcNAc 修饰高度依赖营养，底物由葡萄糖、核苷酸、氨基酸等经己糖胺生物合成途径（HBP）产生[122]。*O*-GlcNAc 修饰与磷酸化都经常发生在丝氨酸残基上，所以在某些丝氨酸位点上出现“Yin-Yang”假说，即这两种修饰可能相互影响[123]。在 MCF-7 细胞中，OGA 抑制剂使 AKT 的 Thr308 和 Ser473 的磷酸化水平降低，表明 *O*-GlcNAcylation 对其在 Thr308 和 Ser473 处的磷酸化有抑制作用[124]。本论文中也发现，20E 可能上调 USP1 的磷酸化水平，敲降 *Oga* 可以使 USP1 保持 *O*-GlcNAc 修饰，无法响应 20E 实现 USP1 的磷酸化（图 3-3），这说明 *O*-GlcNAc 修饰与磷酸化是此消彼长的。取食期幼虫大量进食，体内营养充足，此时 USP1 以 *O*-GlcNAc 修饰状态存在，介导保幼激素信号途径，主要促进幼虫生长。变态时期幼虫不吃少动，*O*-GlcNAc 修饰水平降低，空出的丝氨酸可接受磷酸基团的修饰，进而与 USP1 结合介导蜕皮激素信号转导，引起变态发生。

乙酰化底物乙酰辅酶 A 来自葡萄糖、脂质、氨基酸等营养物质的代谢，其产生与机体的营养状态密切相关。幼虫进入变态期后，在 20E 的诱导下，USP1 既发生磷酸化又发生乙酰化，此时的 USP1 与 ECR 相互作用。进一步的研究表明，磷酸化的 USP1 与 ECRE 的结合增加，乙酰化的 USP1 与 ECR 结合增多。那么，磷酸化和乙酰化之间的关系是怎样的呢？又如何影响与 ECR 的结合的呢？通过在棉铃虫表皮细胞系中过表达野生型、磷酸化位点突变型和乙酰化位点突变型，研究发现，两者是互不影响的（图 2-4）。有研究表明，昆虫变态的启动需要满足两个条件，一是达到“临界体重”，即正常的幼虫实现变态一定要达到的体重[125]；二是蜕皮激素滴度的上升[126]。USP1 上乙酰化和磷酸化的发生，可能就是代表虫体的营养状态和激素滴度都已做好准备，可以启动变态发育。

营养代谢影响翻译后修饰，翻译后修饰影响激素信号转导，这种通过翻译后修饰调节与激素受体的结合从而介导不同信号转导途径的方式可能是细胞响应营养状态变化调节生理活动的方式，是外界环境和生理状态互相交流的一种方式。

2.4.3 不同翻译后修饰的上游调节机制

不同翻译后修饰都受到对应酶的调控。PKC 作为一种经典的丝氨酸磷酸化酶,参与多种细胞信号途径,调节许多重要的细胞过程,如细胞增殖、自噬等[127, 128]。目前研究表明,PKC 负责 USP1 磷酸化[39]。

OGA 作为目前已知的唯一的去除 *O*-GlcNAc 修饰的酶,在多种细胞进程中发挥重要作用,如 DNA 复制[129]等。本文结果表明,敲降 OGA 后,USP1 的 *O*-GlcNAc 修饰无法去除,说明 OGA 负责 USP1 的 *O*-GlcNAc 修饰(图 2-2)。

ACAT1 作为一种乙酰基转移酶,可以使多种蛋白发生乙酰化修饰。本文结果表明,敲降 ACAT1,USP1 乙酰化水平降低(图 2-5),且 ACAT 和 USP1 可直接结合(图 2-7)。ACAT1 被报道常定位于线粒体和细胞质,但 USP1 作为核受体定位于细胞核中,这似乎存在矛盾。但 ACAT 还有其他类似报道,可乙酰化一些易位至细胞核中的蛋白,如 PDC[130]。其中存在几种可能的解释:ACAT 在细胞质中将刚翻译完成的 USP1 乙酰化,其乙酰化后再入核;或者 ACAT 也可以易位入核,详细机制还需后续工作进一步探讨。

此外,在探索 ACAT 的上游调控机制时发现,其蛋白表达水平在变态前后没有明显差异,但琥珀酰化修饰水平在变态时期降低。这提示 ACAT 的转乙酰基功能可能受到去琥珀酰化的调节。SIRT5 作为 SIR2 家族蛋白,发挥去琥珀酰化、去戊二酰化和去乙酰化的活性,在多种生物过程中起关键作用,如调节活性氧水平、癌症[131]等。本研究发现 ACAT1 去琥珀酰化是由 SIRT5 调节的(图 2-8)。

考虑到变态期蜕皮激素 20E 滴度升高,这期间伴随着 USP1 去除 *O*-GlcNAc 修饰,发生磷酸化和乙酰化,ACAT1 去除琥珀酰化,前期实验中还发现 *Oga*、*Pkc* 和 *Sirt5* 受到 20E 在转录水平的调节,这也体现了变态发育是由转录和翻译后修饰多层次协同调控的。

2.5 结论

取食阶段,带有 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合。进入变态时期,一方面 20E 通过 OGA 去除 USP1 第 21 位丝氨酸的 *O*-GlcNAc 修饰,并通过 PKC 催化 21 位丝氨酸发生磷酸化修饰;另一方面 20E 通过 SIRT5 使 ACAT1 去琥珀酰化进而催化 USP1 第 303 位赖氨酸发生乙酰化,磷酸化和乙酰化的 USP1 与 ECR 结合,促进变态发育。这两个位点的进化保守性,为解决 RXR 形成异源二聚体的对象选择问题提供了思路。

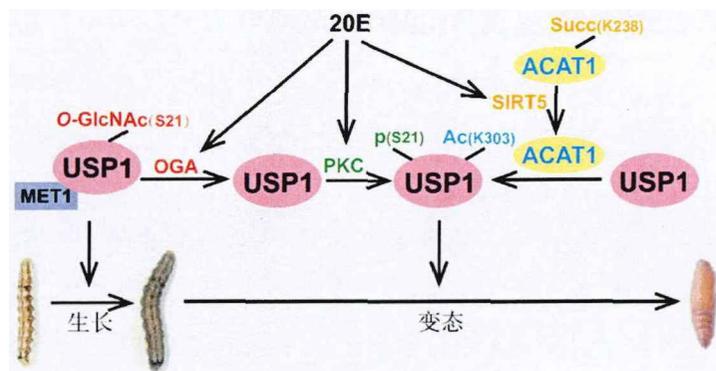


图 2-11 根据本研究结果总结的 USP1 修饰与作用模式

Fig. 2-11 The modification and action mode of USP1 were summarized according to the results of this study

论文创新点总结

1 幼虫取食期, 21 位丝氨酸被 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与保幼激素受体 MET1 结合, 蜕皮变态期, 21 位丝氨酸被磷酸化的 USP1 及 303 位赖氨酸被乙酰化的 USP1 可与蜕皮激素受体 ECR 结合。

2 USP1 的 *O*-GlcNAc 修饰与磷酸化竞争修饰同一位点, 此消彼长; USP1 磷酸化与乙酰化修饰相互独立。

3 去除琥珀酰化的 ACAT1 使 USP1 发生乙酰化。

论文的不足之处

1 *O*-GlcNAc 修饰的 USP1 与 MET1 结合, 乙酰化和磷酸化的 USP1 与 ECR 结合, 这一结论由细胞系实验得出, 仍需体内实验进一步验证。

2 OGA 负责 USP1 的 *O*-GlcNAc 修饰的去除, ACAT1 负责 USP1 乙酰化, 这一结论仅通过 RNAi 实验结果获得, 仍需进一步检测酶的作用机制, 如通过 Co-IP 实验检查酶与底物的结合。

3 此外, 在本研究中, 只鉴定了 USP1 上第 21 位丝氨酸的 *O*-GlcNAc 修饰和磷酸化修饰以及第 303 位的赖氨酸的乙酰化, 是否存在其他位点的翻译后修饰也影响 USP1 互作蛋白的选择仍需进一步探索。

参考文献

- [1] Tompa P. The principle of conformational signaling[J]. Chem Soc Rev. 2016, 45:4252-4284.
- [2] Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors[J]. CSH Perspect Biol. 2013, 5:a016709.
- [3] Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA *et al.* Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid[J]. Genes Dev. 1992, 6:329-344.
- [4] Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions[J]. Trends Endocrinol Metab. 2010, 21:676-683.
- [5] Dawson MI, Xia Z. The retinoid X receptors and their ligands[J]. Biochim Biophys Acta. 2012, 1821:21-56.
- [6] Berrodin TJ, Marks MS, Ozato K *et al.* Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein[J]. Mol Endocrinol. 1992, 6:1468-1478.
- [7] Singh BK, Yen PM. A clinician's guide to understanding resistance to thyroid hormone due to receptor mutations in the TRalpha and TRbeta isoforms[J]. Clin Diabetes Endocrinol. 2017, 3:8.
- [8] Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma[J]. Cell. 2005, 123:993-999.
- [9] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma[J]. Annu Rev Biochem. 2008, 77:289-312.
- [10] Singh Ahuja H, Liu S, Crombie DL *et al.* Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents[J]. Mol Pharmacol. 2001, 59:765-773.
- [11] Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL *et al.* Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists[J]. Nature. 1997, 386:407-410.
- [12] Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ *et al.* Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling[J]. Nature. 1992, 355:446-449.
- [13] Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M *et al.* Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A.

1993, 90:1440-1444.

[14] Perez E, Bourguet W, Gronemeyer H *et al.* Modulation of RXR function through ligand design[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2012, 1821:57-69.

[15] Paquette MA, Atlas E, Wade MG *et al.* Thyroid hormone response element half-site organization and its effect on thyroid hormone mediated transcription[J]. *PLoS One.* 2014, 9:e101155.

[16] Stunnenberg HG. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors[J]. *Bioessays.* 1993, 15:309-315.

[17] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors[J]. *Cell.* 1995, 83:841-850.

[18] Sanguedolce MV, Leblanc BP, Betz JL *et al.* The promoter context is a decisive factor in establishing selective responsiveness to nuclear class II receptors[J]. *EMBO J.* 1997, 16:2861-2873.

[19] Gampe RT, Jr., Montana VG, Lambert MH *et al.* Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix[J]. *Genes Dev.* 2000, 14:2229-2241.

[20] Egea PF, Rochel N, Birck C *et al.* Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR[J]. *J Mol Biol.* 2001, 307:557-576.

[21] Kersten S, Kelleher D, Chambon P *et al.* Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution[J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92:8645-8649.

[22] Szanto A, Narkar V, Shen Q *et al.* Retinoid X receptors: X-ploring their (patho) physiological functions[J]. *Cell Death Differ.* 2004, 11 Suppl 2:S126-143.

[23] Sharma S, Shen T, Chitranshi N *et al.* Retinoid X Receptor: cellular and biochemical roles of nuclear receptor with a focus on neuropathological involvement[J]. *Mol Neurobiol.* 2022. 59:2027-2050.

[24] Ardenkjaer-Larsen J, Rupaar K, Sinkeviciute G *et al.* Insulin-induced serine 22 phosphorylation of retinoid X receptor alpha is dispensable for adipogenesis in brown adipocytes[J]. *Adipocyte.* 2020, 9:142-152.

[25] Tang J, Zhong G, Zhang H *et al.* LncRNA DANCR upregulates PI3K/AKT signaling through activating serine phosphorylation of RXRA[J]. *Cell Death Dis.* 2018, 9:1167.

[26] Solomon C, White JH, Kremer R. Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent signal transduction by phosphorylating human

- retinoid X receptor alpha[J]. *J Clin Invest.* 1999, 103:1729-1735.
- [27] Jusu S, Presley JF, Kremer R. Phosphorylation of human Retinoid X Receptor alpha at serine 260 impairs its subcellular localization, receptor interaction, nuclear mobility, and 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3-dependent DNA binding in ras-transformed keratinocytes[J]. *J Biol Chem.* 2017, 292:1490-1509.
- [28] Zhao WX, Tian M, Zhao BX *et al.* Orphan receptor TR3 attenuates the p300-induced acetylation of retinoid X receptor-alpha[J]. *Mol Endocrinol.* 2007, 21:2877-2889.
- [29] Wang R, Wang G. Protein modification and autophagy activation[J]. *Adv Exp Med Biol.* 2019, 1206:237-259.
- [30] Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update[J]. *Trends Biochem Sci.* 2000, 25:596-601.
- [31] Miller ML, Jensen LJ, Diella F *et al.* Linear motif atlas for phosphorylation-dependent signaling[J]. *Sci Signal.* 2008, 1:ra2.
- [32] Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function[J]. *Physiol Rev.* 2008, 88:1341-1378.
- [33] Hurley JH, Newton AC, Parker PJ *et al.* Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains[J]. *Protein Sci.* 1997, 6:477-480.
- [34] Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation[J]. *EMBO J.* 2000, 19:496-503.
- [35] Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV *et al.* Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis[J]. *J Exp Med.* 1996, 184:2399-2404.
- [36] Yuan LW, Soh JW, Weinstein IB. Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1592:205-211.
- [37] Yoshida K, Wang HG, Miki Y *et al.* Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9[J]. *EMBO J.* 2003, 22:1431-1441.
- [38] Chen CH, Pan J, Di YQ *et al.* Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017, 114:E7121-E7130.
- [39] Liu W, Cai MJ, Zheng CC *et al.* Phospholipase Cgamma1 connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling[J]. *J Biol Chem.* 2014, 289:13026-13041.

- [40] Jing YP, Liu W, Wang JX *et al.* The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression[J]. *J Biol Chem.* 2015, 290:8469-8481.
- [41] Ardito F, Giuliani M, Perrone D *et al.* The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)[J]. *Int J Mol Med.* 2017, 40:271-280.
- [42] Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc[J]. *J Biol Chem.* 1984, 259:3308-3317.
- [43] Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance[J]. *J Biol Chem.* 1991, 266:4706-4712.
- [44] Dennis JW, Lau KS, Demetriou M *et al.* Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation[J]. *Traffic.* 2009, 10:1569-1578.
- [45] Hu Y, Suarez J, Fricovsky E *et al.* Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose[J]. *J Biol Chem.* 2009, 284:547-555.
- [46] Slawson C, Housley MP, Hart GW. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks[J]. *J Cell Biochem.* 2006, 97:71-83.
- [47] Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats[J]. *J Biol Chem.* 1997, 272:9308-9315.
- [48] Lubas WA, Frank DW, Krause M *et al.* O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats[J]. *J Biol Chem.* 1997, 272:9316-9324.
- [49] Gao Y, Wells L, Comer FI *et al.* Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain[J]. *J Biol Chem.* 2001, 276:9838-9845.
- [50] Seo HG, Kim HB, Kang MJ *et al.* Identification of the nuclear localisation signal of O-GlcNAc transferase and its nuclear import regulation[J]. *Sci Rep.* 2016, 6:34614.
- [51] Woo CM, Lund PJ, Huang AC *et al.* Mapping and quantification of over 2000 O-linked glycopeptides in activated human T cells with isotope-targeted glycoproteomics

- (Isotag)[J]. *Mol Cell Proteomics*. 2018, 17:764-775.
- [52] Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND *et al.* *O*-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose[J]. *J Biol Chem*. 2008, 283:16283-16292.
- [53] Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ *et al.* Dynamic *O*-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin[J]. *Biochemistry*. 1996, 35:3578-3586.
- [54] Cervoni L, Turano C, Ferraro A *et al.* Glycosylation of RNA polymerase II from wheat germ[J]. *FEBS Lett*. 1997, 417:227-230.
- [55] Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW. Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with *O*-GlcNAc transferase[J]. *J Biol Chem*. 2003, 278:5399-5409.
- [56] Ma J, Hart GW. Protein *O*-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications[J]. *Expert Rev Proteomics*. 2013, 10:365-380.
- [57] Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T *et al.* *O*-GlcNAcylation: a new cancer hallmark?[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013, 4:99.
- [58] Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA *et al.* The emerging link between *O*-GlcNAc and Alzheimer disease[J]. *J Biol Chem*. 2014, 289:34472-34481.
- [59] Park J, Chen Y, Tishkoff DX *et al.* SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways[J]. *Mol Cell*. 2013, 50:919-930.
- [60] Xu Y, Shi Z, Bao L. An expanding repertoire of protein acylations[J]. *Mol Cell Proteomics*. 2022, 21:100193.
- [61] Phillips DM. The presence of acetyl groups of histones[J]. *Biochem J*. 1963, 87:258-263.
- [62] Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain[J]. *Cell*. 1997, 90:595-606.
- [63] Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019, 20:156-174.
- [64] Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M *et al.* Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans[J]. *Mitochondrion*. 2019, 46:73-90.
- [65] Abdelkreem E, Harijan RK, Yamaguchi S *et al.* Mutation update on ACAT1 variants associated with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency[J]. *Hum Mutat*. 2019, 40:1641-1663.
- [66] Fan J, Lin R, Xia S *et al.* Tetrameric Acetyl-CoA Acetyltransferase 1 is important for tumor growth[J]. *Mol Cell*. 2016, 64:859-874.
- [67] Li M, Wang Z, Wang P *et al.* TFEB: a emerging regulator in lipid homeostasis for

- atherosclerosis[J]. *Front Physiol.* 2021, 12:639920.
- [68] Sabari BR, Zhang D, Allis CD *et al.* Metabolic regulation of gene expression through histone acylations[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016, 18:90-101.
- [69] Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012, 13:225-238.
- [70] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB *et al.* Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6[J]. *Cell.* 2006, 124:315-329.
- [71] Tanno M, Sakamoto J, Miura T *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1[J]. *J Biol Chem.* 2007, 282:6823-6832.
- [72] Vaquero A, Scher MB, Lee DH *et al.* Sirt2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis[J]. *Genes Dev.* 2006, 20:1256-1261.
- [73] Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T *et al.* Mitochondrial sirtuins[J]. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1804:1645-1651.
- [74] Ford E, Voit R, Liszt G *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription[J]. *Genes Dev.* 2006, 20:1075-1080.
- [75] Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K *et al.* SIRT4 is a lysine deacylase that controls leucine metabolism and insulin secretion[J]. *Cell Metab.* 2017. 25:838-855 e815.
- [76] Du J, Zhou Y, Su X *et al.* Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase[J]. *Science.* 2011, 334:806-809.
- [77] Peng C, Lu Z, Xie Z *et al.* The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme[J]. *Mol Cell Proteomics.* 2011, 10:M111 012658.
- [78] Tan M, Peng C, Anderson KA *et al.* Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5[J]. *Cell Metab.* 2014. 19:605-617.
- [79] Jiang H, Khan S, Wang Y *et al.* SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine[J]. *Nature.* 2013. 496:110-113.
- [80] Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y *et al.* SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation[J]. *Nature.* 2012. 487:114-118.
- [81] Li L, Shi L, Yang S *et al.* SIRT7 is a histone desuccinylase that functionally links to chromatin compaction and genome stability[J]. *Nat Commun.* 2016. 7:12235.
- [82] Bao X, Liu Z, Zhang W *et al.* Glutarylation of histone H4 lysine 91 regulates chromatin dynamics[J]. *Mol Cell.* 2019, 76:660-675 e669.
- [83] Zhang Z, Tan M, Xie Z *et al.* Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification[J]. *Nat Chem Biol.* 2011, 7:58-63.

- [84] Papanicolaou KN, O'Rourke B, Foster DB. Metabolism leaves its mark on the powerhouse: recent progress in post-translational modifications of lysine in mitochondria[J]. *Front Physiol.* 2014, 5:301.
- [85] Wang Y, Guo YR, Liu K *et al.* KAT2A coupled with the alpha-KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase[J]. *Nature.* 2017, 552:273-277.
- [86] Kurmi K, Hitosugi S, Wiese EK *et al.* Carnitine Palmitoyltransferase 1A has a lysine succinyltransferase activity[J]. *Cell Rep.* 2018, 22:1365-1373.
- [87] Yang G, Yuan Y, Yuan H *et al.* Histone acetyltransferase 1 is a succinyltransferase for histones and non-histones and promotes tumorigenesis[J]. *EMBO Rep.* 2021, 22:e50967.
- [88] Wang C, Zhang C, Li X *et al.* CPT1A-mediated succinylation of S100A10 increases human gastric cancer invasion[J]. *J Cell Mol Med.* 2019, 23:293-305.
- [89] Yang X, Wang Z, Li X *et al.* SHMT2 desuccinylation by SIRT5 drives cancer cell proliferation[J]. *Cancer Res.* 2018, 78:372-386.
- [90] Dai JD, Gilbert LI. Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland[J]. *Dev Biol.* 1991, 144:309-326.
- [91] Wilson TG, Fabian J. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone[J]. *Dev Biol.* 1986, 118:190-201.
- [92] Baumann A, Fujiwara Y, Wilson TG. Evolutionary divergence of the paralogs Methoprene tolerant (Met) and germ cell expressed (gce) within the genus *Drosophila*[J]. *J Insect Physiol.* 2010, 56:1445-1455.
- [93] Li M, Mead EA, Zhu J. Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, 108:638-643.
- [94] He Q, Zhang Y, Zhang X *et al.* Nucleoporin Nup358 facilitates nuclear import of Methoprene-tolerant (Met) in an importin β - and Hsp83-dependent manner[J]. *Insect Biochem Molec.* 2017, 81:10-18.
- [95] Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM. Kruppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*[J]. *Mech Dev.* 2008, 125:91-105.
- [96] Liu W, Zhang FX, Cai MJ *et al.* The hormone-dependent function of Hsp90 in the crosstalk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways in insects is determined by differential phosphorylation and protein interactions[J].

Biochim Biophys Acta. 2013, 1830:5184-5192.

[97] Zhao WL, Liu CY, Liu W *et al.* Methoprene-tolerant 1 regulates gene transcription to maintain insect larval status[J]. J Mol Endocrinol. 2014. 53:93-104.

[98] Bilen J, Atallah J, Azanchi R *et al.* Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110:18321-18326.

[99] Qu Z, Kenny NJ, Lam HM *et al.* How did arthropod sesquiterpenoids and ecdysteroids arise? Comparison of hormonal pathway genes in noninsect arthropod genomes[J]. Genome Biol Evol. 2015, 7:1951-1959.

[100] Smith SL, Bollenbacher WE, Gilbert LI. Ecdysone 20-monooxygenase activity during larval-pupal development of *Manduca sexta*[J]. Mol Cell Endocrinol. 1983, 31:227-251.

[101] Kozlova T, Thummel CS. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*[J]. Trends Endocrinol Metab. 2000. 11:276-280.

[102] Cai MJ, Zhao WL, Jing YP *et al.* 20-Hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting[J]. Development. 2016, 143:1005-1015.

[103] Oro AE, McKeown M, Evans RM. Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor[J]. Nature. 1990, 347:298-301.

[104] Billas IM, Moulinier L, Rochel N *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects[J]. J Biol Chem. 2001, 276:7465-7474.

[105] Clayton GM, Peak-Chew SY, Evans RM *et al.* The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98:1549-1554.

[106] Di YQ, Han XL, Kang XL *et al.* Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis[J]. Autophagy. 2021, 17:1170-1192.

[107] Henrich VC, Sliter TJ, Lubahn DB *et al.* A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue[J]. Nucleic Acids Res. 1990. 18:4143-4148.

[108] Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms[J].

Cell. 1993, 73:1323-1337.

[109] Tzertzinis G, Malecki A, Kafatos FC. BmCF1, a *Bombyx mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila* ultraspiracle[J]. J Mol Biol. 1994, 238:479-486.

[110] Kamimura M, Tomita S, Kiuchi M *et al.* Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms -- ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands[J]. Eur J Biochem. 1997, 248:786-793.

[111] Jindra M, Huang JY, Malone F *et al.* Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*[J]. Insect Mol Biol. 1997, 6:41-53.

[112] Jindra M, Malone F, Hiruma K *et al.* Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. Dev Biol. 1996, 180:258-272.

[113] Fujiwara H, Jindra M, Newitt R *et al.* Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings[J]. Insect Biochem Mol Biol. 1995, 25:845-856.

[114] Kapitskaya M, Wang S, Cress DE *et al.* The mosquito ultraspiracle homologue, a partner of ecdysteroid receptor heterodimer: cloning and characterization of isoforms expressed during vitellogenesis[J]. Mol Cell Endocrinol. 1996, 121:119-132.

[115] Parthasarathy R, Palli SR. Stage- and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. J Insect Physiol. 2007, 53:216-229.

[116] Zheng WW, Yang DT, Wang JX *et al.* Hsc70 binds to ultraspiracle resulting in the upregulation of 20-hydroxyecdysone-responsive genes in *Helicoverpa armigera*[J]. Mol Cell Endocrinol. 2010, 315:282-291.

[117] Zhao XF, An XM, Wang JX *et al.* Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development[J]. Arch Insect Biochem Physiol. 2005, 58:39-46.

[118] Liu CY, Liu W, Zhao WL *et al.* Upregulation of the expression of prodeath serine/threonine protein kinase for programmed cell death by steroid hormone 20-hydroxyecdysone[J]. Apoptosis. 2013, 18:171-187.

[119] Sillen A, Barbier P, Landrieu I *et al.* NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules[J]. Biochemistry. 2007, 46:3055-3064.

[120] Francisco-Velilla R, Embarc-Buh A, Abellan S *et al.* Phosphorylation of T897 in

- the dimerization domain of Gemin5 modulates protein interactions and translation regulation[J]. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022, 20:6182-6191.
- [121] Przibilla S, Hitchcock WW, Szecsi M *et al*. Functional studies on the ligand-binding domain of Ultraspiracle from *Drosophila melanogaster*[J]. *Biol Chem*. 2004, 385:21-30.
- [122] Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of *O*-GlcNAc[J]. *J Cell Biol*. 2015, 208:869-880.
- [123] Chatham JC, Zhang J, Wende AR. Role of *O*-Linked N-Acetylglucosamine protein modification in cellular (patho) physiology[J]. *Physiol Rev*. 2021, 101:427-493.
- [124] Datta K, Wang S, Huang X *et al*. Extensive crosstalk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling[J]. *PLoS One*. 2012, 7.
- [125] Nijhout HF, Williams CM. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation[J]. *J Exp Biol*. 1974, 61:493-501.
- [126] Truman JW, Riddiford LM. Physiology of insect rhythms. 3. The temporal organization of the endocrine events underlying pupation of the tobacco hornworm[J]. *J Exp Biol*. 1974, 60:371-382.
- [127] Cooke M, Kazanietz MG. Overarching roles of diacylglycerol signaling in cancer development and antitumor immunity[J]. *Sci Signal*. 2022, 15:eabo0264.
- [128] Zhao M, Duan XF, Zhao XY *et al*. Protein kinase Cdelta stimulates proteasome-dependent degradation of C/EBPalpha during apoptosis induction of leukemic cells[J]. *PLoS One*. 2009, 4:e6552.
- [129] Lanza C, Tan EP, Zhang Z *et al*. Reduced *O*-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects[J]. *Cell Cycle*. 2016, 15:1363-1375.
- [130] He Y, Gao M, Cao Y *et al*. Nuclear localization of metabolic enzymes in immunity and metastasis[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017, 1868:359-371.
- [131] Fabbrizi E, Fiorentino F, Carafa V *et al*. Emerging roles of SIRT5 in metabolism, cancer, and SARS-CoV-2 infection[J]. *Cells*. 2023, 12.