

β -淀粉样蛋白基元序列寡聚化及纤维化的功能研究*

石镜明, 李岩松, 陈文玲, 贺学, 吴涛, 武美娜

(西藏民族大学 基础医学院, 高原环境与疾病相关基因研究实验室, 陕西 咸阳 712082)

摘要:【目的】 β -淀粉样蛋白形成的寡聚体是引起阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)发病的主要原因之一, 研究 β -淀粉样蛋白各段序列在寡聚和纤维化过程中的作用, 以便更好地阐明该蛋白的寡聚机制和毒性作用。【方法】以C-端及N-端删节的6种 β -淀粉样肽段作为研究对象, 通过硫磺素T荧光检测、Tris-Tricine电泳、透射电镜等方法定性定量分析这些肽段的寡聚化和纤维化能力。【结果】1) 氨基酸37~42具有增强 $A\beta$ 寡聚化和纤维化的功能; 2) 氨基酸18~36对于寡聚和纤维化很重要, 但不能缺少N-端的参与; 3) $A\beta$ 1-17参与 β -淀粉样蛋白长纤维的形成。【结论】 β -淀粉样蛋白各段氨基酸序列对该蛋白寡聚和纤维化所贡献的不同作用, 这对于 β -淀粉样蛋白毒性机制的研究起到一定的帮助作用。

关键词: β -淀粉样蛋白; 删节肽段; 寡聚; 纤维

中图分类号: Q518.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2017)01-0095-05

阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)是一种很典型的神经退行性疾病, 全球共有4 000余万AD患者, 大约70%的病例是由AD所致, 并预计这个数字每20年将翻一番^[1]。AD脑组织病理变化是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, $A\beta$)形成神经炎斑在神经细胞外沉积及tau蛋白在神经细胞内磷酸化(p-tau)形成神经纤维化缠结(NFTs)。尽管AD的发病机理仍然不能确定, 但人们普遍认为可溶性 $A\beta$ 寡聚化是导致AD发病的主要原因^[2]。在国际上, $A\beta$ 1-42、T-tau蛋白和p-tau蛋白作为生物标识物加以检测, 已经被认为是预防和治疗AD不可缺少的一部分工作, 它们对于疾病的鉴定、早期诊断、预防及治疗起到帮助作用^[3]。 $A\beta$ 蛋白由它的前体蛋白(APP)经过 β 和 γ 两种分泌酶加工产生, 主要肽段有 $A\beta$ 1-40和 $A\beta$ 1-42两种, $A\beta$ 1-42更容易寡聚^[2,4]。近些年来, 人们将寡聚体进行分类, 并研究了各种寡聚体的毒性, 其中被广泛研究的两种毒性很强的寡聚体包括: 纤维中间体——原纤维(protofibrils)及低分子量聚集体混合物——ADDLs(β -derived diffusible ligands, 为3-24聚的混合物)^[5]。

为了解释 $A\beta$ 单体在寡聚体及纤维中的结构及毒性, 人们采用NMR及X-ray晶体学方法对 $A\beta$ 突变体或肽段做了许多研究, 认为 $A\beta$ 42原纤维形式可以通过结构变换从而形成纤维, 主要过程包括每一个单位的 $A\beta$ 松散聚合的strands以平行的方式结合形成 β -sheet结构^[6-8], 而这个过程起始于Gln15和Gly37的连接。所以各种形式的寡聚都可以变换形成纤维, $A\beta$ 单体在寡聚和纤维中通过一个 β -转角- β 结构发挥毒性。 $A\beta$ 1-42残基1~10并没有特定, 残基11~40采用 β -转角- β 结构。在 $A\beta$ 42纤维中, 残基1~17可能是无组织结构, 残基18~42形成 β -转角- β 折叠。在 $A\beta$ 1-40和 $A\beta$ 1-42, β -转角构象稳定依靠疏水相互作用和Asp23与Lys28之间形成盐桥^[8], 尽管寡聚体和纤维的晶体构象得到大量研究, 但各基元序列对整个 $A\beta$ 1-42的寡聚化和纤维化能力却并没有得到比较和分析。

本研究使用 $A\beta$ 在C-端及N-端的删节突变体, 通过电泳、电镜、硫磺素T(ThT)荧光吸收等方法检测 $A\beta$ 形成寡聚体和纤维的能力, 以阐明各段序列在 $A\beta$ 寡聚和纤维化中的交互作用。其中, $A\beta$ 17-42是 α -分泌酶水解前体蛋白形成的P3蛋白; $A\beta$ 11-42为验证 $A\beta$ 1-10的作用; 选择 $A\beta$ 1-28是因为它属于胞外肽段, 不含有疏水肽段, 观察它是否会形成寡聚体以探究疏水作用对寡聚是否存在影响; $A\beta$ 1-42在C-端较 $A\beta$ 1-40多出两个氨基酸, 但寡聚能力却明显增强; $A\beta$ 1-36比 $A\beta$ 1-40在C-端要少4个氨基酸, 选择 $A\beta$ 1-36以便更好地观察C-端在寡聚和纤维中的作用。这些工作将为阐明 $A\beta$ 在AD中的毒性作用, 以及针对寡聚体进行药物设计方面提供很好的帮助。

* 收稿日期: 2016-03-24 修回日期: 2016-05-24 网络出版时间: 2017-01-12 11:34

资助项目: 西藏自治区自然科学基金(No. 12KJZRZMY02, 2015zr-13-12)

第一作者简介: 石镜明, 男, 讲师, 博士, 研究方向为蛋白质的结构与功能, E-mail: shijingming5272@126.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20170112.1134.034.html>

1 材料与方法

1.1 实验材料

A β 1-40、A β 1-42 均购自 rPeptide 公司(雅典,希腊),A β 17-42,A β 11-42,A β 1-28 及 A β 1-36 均由 Anaspec 公司合成(圣何塞,美国),HPLC 纯度大于 97%。硫磺素 T、HFIP(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)、DMSO 购自 Sigma 公司 F-12 培养基(Ham's F-12)购自 BioSource 公司;主要仪器有荧光光谱仪(型号:PELS5S,美国 perkin elmer 仪器公司),TecnaiTM 透射电子显微镜(型号:G20,荷兰 FEI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 A β 肽段单体化处理 1 mg A β 瓶中加入 222 μ L HFIP,在旋涡振荡 5 min,4 $^{\circ}$ C 慢摇过夜,按每管 8.6 μ L 分装,N₂ 流吹干,-80 $^{\circ}$ C 下冻存储备用^[3]。

1.2.2 寡聚体及纤维制备条件 A β 肽段加入到 Tris 缓冲液(50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris,100 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, pH 值为 7.4)浓度为 200 μ mol $\cdot$ L⁻¹,室温下孵育,并在不同时间段取出样品进行实验^[4]。

1.2.3 电泳条件 浓缩胶采用稳流 30 mA,分离胶采用 40 mA,4%浓缩胶和 16.5% Tris-Tricine 分离胶进行单体和寡聚体检测。

1.2.4 电镜制样 A β 溶液 2 μ L 加到放电/亲水化处理的碳膜上,孵育 1 min 后,用超纯水清洗,2% 醋酸双氧铀染色 1 min,将多余的液体吸掉,然后将筛格在空气中干燥。电镜放大倍数为 50 000 倍,所用电镜负染的染料为醋酸铀,蛋白质量浓度为 80 ng $\cdot$ μ L⁻¹。

1.2.5 ThT 荧光检测 硫黄素 T(Thioflavin T,简称 ThT)1 μ mol $\cdot$ L⁻¹样品与 5 μ mol $\cdot$ L⁻¹ A β 加入 Tris 缓冲液(50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, pH 值为 7.4)中,采用激发光 440 nm/发射光 490 nm 检测记录数据,狭缝开口 10 nm,室温搅拌检测 ThT 动力学变化或将放置的样品直接进行检测。

2 实验结果

2.1 ThT 检测 A β 各肽段纤维化能力

ThT 荧光吸收检测淀粉质蛋白的纤维化是 A β 纤维定性定量的检测方法,在许多文献报道中得到应用^[11-12],本研究采用 ThT 检测 A β 肽段在单体状态、孵育 3 d 及 7 d 时的样品,实验结果如图 1 所示。

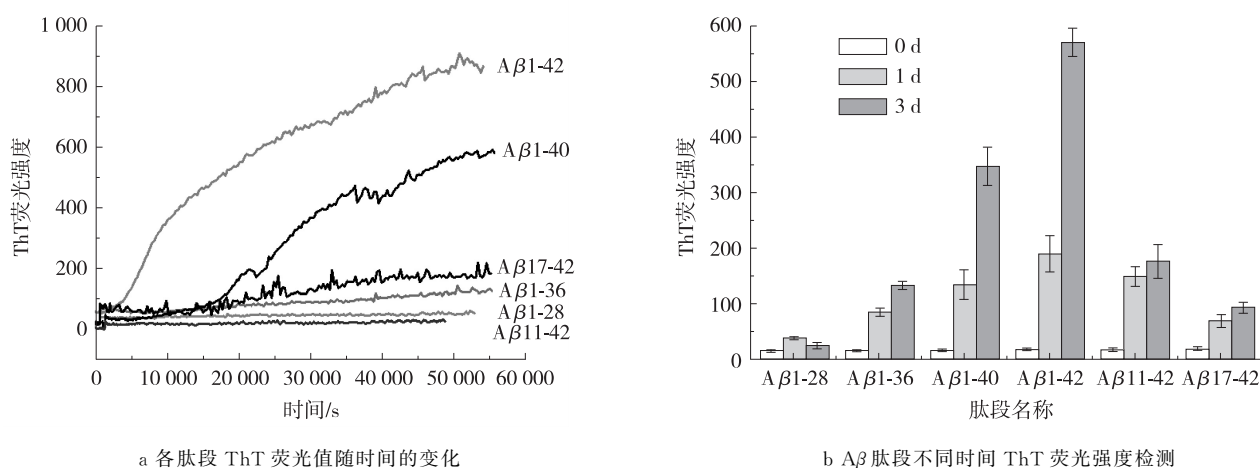


图 1 ThT 检测不同孵育时间 A β 肽段的纤维化能力

Fig. 1 ThT detection of A β fibrillation capability of different incubation time

C-端删节的肽段,A β 1-42、A β 1-40 具有较强的纤维化能力,但 A β 1-42 最为显著,相对于 A β 1-42 和 A β 1-40 来说,A β 1-36 纤维化并不明显,即使在室温下孵育 7 d,仍然未出现纤维化。A β 1-28 荧光值最低,表明 A β 1-28 几乎不形成纤维。因此,C-端氨基酸删节的 A β 表现出纤维能力强弱顺序为:A β 1-42 最强,然后依次为 A β 1-40, A β 1-36,A β 1-28。N-端删节的肽段,A β 17-42 具有少量纤维,而 A β 11-42 几乎不含有纤维,从数值上可以看出纤维能力强弱顺序为:A β 1-42 最强,然后依次为 A β 17-42,A β 11-42。为了进一步比较这些肽段寡聚和纤维化能力,本研究还将孵育的短肽进行电泳和电镜分析。

2.2 电泳检测 $A\beta$ 各肽段寡聚能力

通过 ThT 检测看出各短肽形成纤维的能力,但依然不能确定哪种短肽的寡聚能力较强,通过 16.5% 的 Tris-tricine 胶分析肽段的寡聚能力。结果如图 2 所示。

由于 SDS 变性剂的存在,以及聚丙烯酰胺孔道对于各种形式寡聚体分子的挤压,可能使得电泳结果仅显示 1 d 及 3 d 结果中,以单体、3-聚、和 4-聚这 3 种为主要形式的条带,只是单体样品的电泳条带中 3-聚、4-聚含量相对较大,这与之前的报道相符合^[5];包括很“著名”的 $A\beta$ 寡聚体形式——ADDL($A\beta$ -derived diffusible ligands),电泳看起来非常均匀,但事实上却是 1 种 3-聚到 24-聚的 20 余种聚集体成分的混合物^[2]。对 $A\beta_{1-40}$ 而言,2-聚体的含量明显加大,因此在评估寡聚能力时,可以定性地看肽段单体的含量减少及部分样品寡聚条带的增加。

由图 2 可以看出:1) 在单体化处理蛋白以后(图 2a),除了 $A\beta_{1-28}$ 以 2-聚体形式出现, $A\beta_{1-42}$ 出现 3-聚和 4-聚条带,其他几种短肽均不会出现寡聚体;2) 1 d 的样品中,

$A\beta_{1-28}$ 出现 2-聚体, $A\beta_{1-42}$ 出现 3-聚和 4-聚条带,且 3-聚 4-聚条带的灰度值比单体增大, $A\beta_{1-40}$ 出现极少量 2-聚体,但 $A\beta_{1-36}$ 没有变化, $A\beta_{11-42}$ 及 $A\beta_{17-42}$ 也会出现寡聚条带;3) 3 d 的样品与 1 d 的样品相比,仅 $A\beta_{1-40}$ 出现较大量的 2 聚体条带,其它短肽没有明显的寡聚体出现;4) 第 7 d 的样品, $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 变化明显,出现较多寡聚条带, $A\beta_{1-36}$ 出现极少量寡聚。其他短肽没有明显变化。单从电泳条带可以看出:C-端删节的肽段中, $A\beta_{1-42}$ 非常容易寡聚, $A\beta_{1-40}$ 寡聚次之, $A\beta_{1-36}$ 很难寡聚,但 $A\beta_{1-28}$ 始终呈现出 2-聚体;N-端删节的肽段中, $A\beta_{11-42}$ 及 $A\beta_{17-42}$ 均容易寡聚。

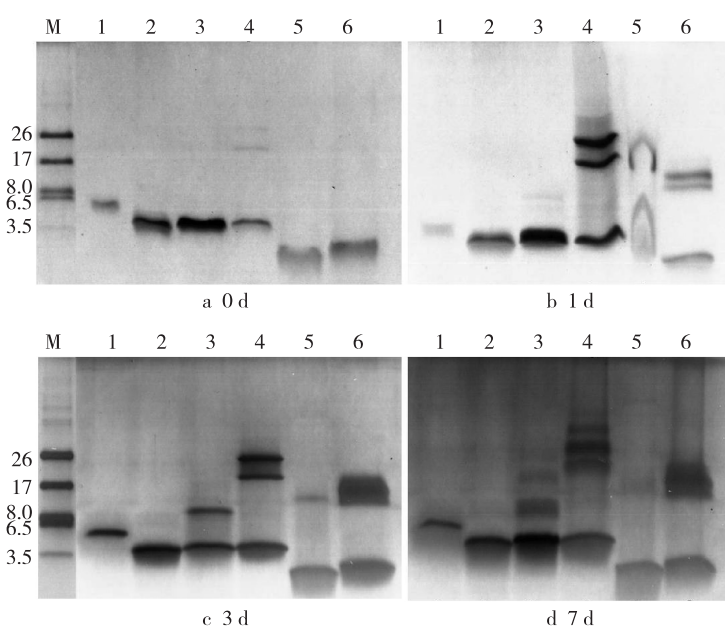
2.3 电泳检测 $A\beta$ 各肽段寡聚和纤维化结构

电泳仅能看出 SDS 处理后的 $A\beta$ 肽段寡聚情况,但是由于 SDS 变性剂的存在以及聚丙烯酰胺孔道对于各种形式寡聚体分子的挤压,这些条带并不能完全反映各 $A\beta$ 肽段在溶液中呈现怎样的结构,因此,为了研究 $A\beta$ 肽段本身的寡聚或纤维状态,采用电泳观察 $A\beta$ 肽段在孵育 3 d 和 7 d 后的样品状态。电泳结果如图 3 所示。

通过透射电镜观察,可以得到以下结果:1) C-端删节的肽段中, $A\beta_{1-42}$ 在 3 d 时形成明显的原纤维,7 d 会形成较明显的纤维; $A\beta_{1-40}$ 在 3 d 样品中形成明显的原纤维,7 d 样品也会形成较明显的纤维; $A\beta_{1-36}$ 仅在 7 d 的样品中出现少量寡聚体,但并没有纤维形式聚集体出现; $A\beta_{1-28}$ 几乎看不到寡聚体,结合电泳分析,可能是因为 $A\beta_{1-28}$ 的 2-聚体太小,不能通过电镜观察到。2) N-端删节的肽段中, $A\beta_{17-42}$ 形成较短的细纤维, $A\beta_{11-42}$ 会出现聚集的原纤维状结构,却始终不会形成长纤维状结构。由此可见,6 种短肽中,仅 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 可形成纤维、但 $A\beta_{17-42}$ 会形成细丝状的短纤维, $A\beta_{1-28}$ 、 $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{11-42}$ 不形成纤维,这与前面部分 ThT 纤维的检测结果及电泳结果相符。

3 讨论及分析

综合以上实验结果可以比较出 $A\beta$ 肽段的寡聚和纤维能力的强弱。通过电镜和电泳比较寡聚能力可知, $A\beta_{1-42}$ 最强, $A\beta_{1-40}$ 次之, $A\beta_{1-36}$ 再次之,而 $A\beta_{1-28}$ 常呈现出 2-聚体; $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{17-42}$ 、 $A\beta_{11-42}$ 均具有较强的寡聚能力。通过 ThT 及电镜比较纤维化能力可知, $A\beta_{1-42}$ 最强,然后依次为 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-28}$; $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{17-42}$ 、 $A\beta_{11-42}$ 。这说明:1) C-端结构对于 $A\beta$ 蛋白的寡聚和纤维化具有重要作用;2) 缺少 N-端的 $A\beta$ 肽段仍然具有很强的寡聚能力,但缺少 N-端的 $A\beta$ 肽段并没有呈现出很强的纤维化能力,说明 N-端具有稳



注:M为marker;1~6分别为 $A\beta_{1-28}$ 、 $A\beta_{1-36}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{11-42}$ 、 $A\beta_{17-42}$ 。

图 2 电泳分析不同孵育时间 $A\beta$ 各肽段寡聚,胶使用银染显色

Fig. 2 Electrophoresis analyses of the six $A\beta$ peptides in different time duration, the gels were stained with silver staining

定 A β 1-42 纤维化作用,这是因为 A β 11-42 几乎不能形成纤维,而 A β 17-42 仅形成短细纤维,但不能形成较长的类似 A β 1-42 的纤维。

以往的文献报道 A β 1-42 序列,氨基酸 1~10 呈现无序结构,也就是说, A β 11-42 很可能呈现出与 A β 1-42 相似的寡聚和纤维化功能。本研究结果显示, A β 1-42 与 A β 11-42 均容易呈现出原纤维状的寡聚结构,但 A β 11-42 却不能将原纤维状的寡聚体结合形成纤维状结构。有意思的是, A β 17-42 不仅可以寡聚,还能形成短细的纤维结构。这说明 A β 17-42 分子间的作用力较 A β 11-42 分子间的作用更强。根据 NMR 及分子模拟结果显示, A β 1-42 寡聚体或纤维在单个分子内会呈现一个由 17~21 与 29~36 之间形成的 β -发夹结构^[13-14],而这个发夹结构是寡聚和纤维化的基础, A β 17-42 很可能比 A β 11-42 更容易形成 β -发夹结构,从而更容易产生寡聚和短细纤维结构。

结合先前研究结果^[6-8,13-15]及图 4 可以得到如下结论:1) 从寡聚能力来看, A β 1-42 强于 A β 1-40,后者又强于 A β 1-36,这说明 A β 37-42 能增强 A β 寡聚化; A β 1-28 及 A β 1-36 无纤维,说明 A β 37-42 能增强 A β 纤维化。因此,氨基酸 37~42 具有增强 A β 纤维化的功能。2) A β 1-28 及 A β 1-36 缺少 C-端, A β 17-42 及 A β 11-42 缺少 N-端,使得 A β 11-42 不能形成纤维,而 A β 17-42 电镜下只呈现出短细纤维, ThT 荧光值也相对较低,这显示 A β 17-42 不能形成较长纤维,这些结果说明 A β 18-36 区域对于寡聚和纤维化很重要,但不能缺少 C-端和 N-端的作用。3) A β 1-42 及 A β 1-40 能形成长纤维,而 A β 17-42 仅能形成较短的细纤维,这说明氨基酸 1~17 对于产生长纤维具有一定的作用,而不仅仅是一个无序结构。相关数据还需要核磁共振(NMR)等构象数据验证各氨基酸之间的相互作用来进一步

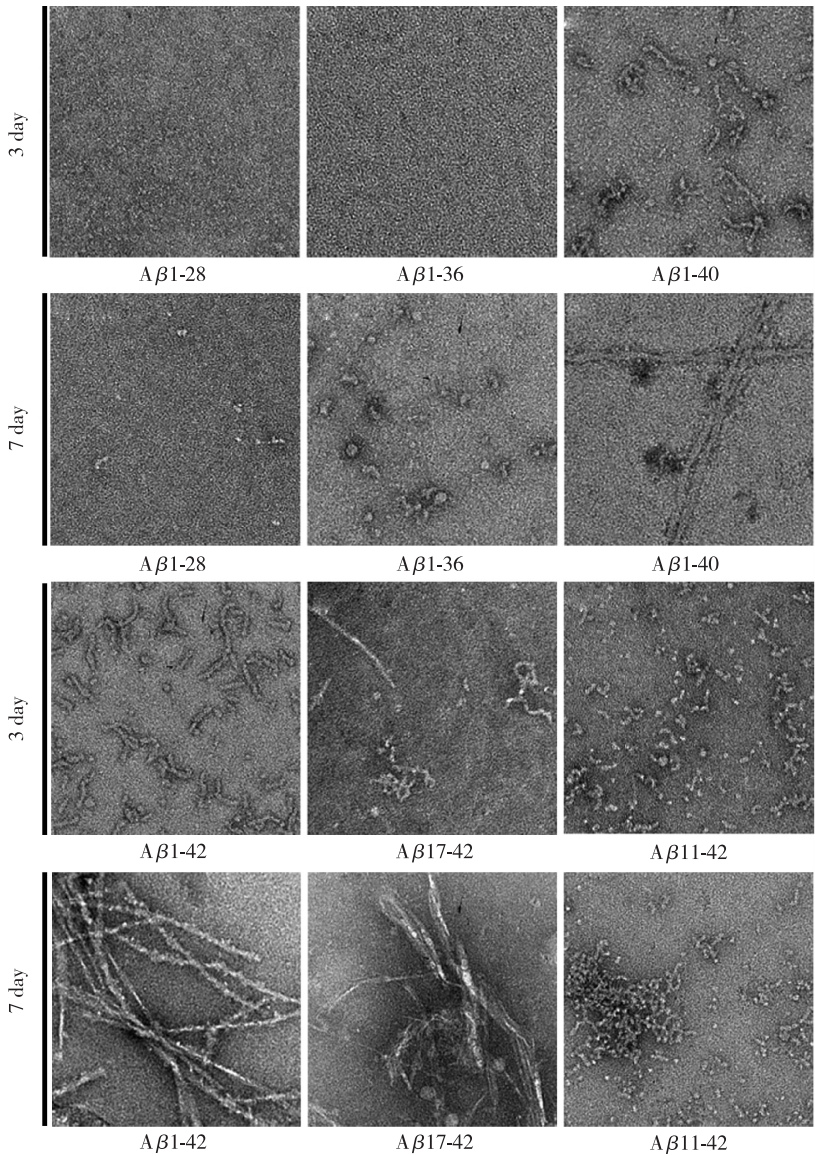


图 3 电泳分析不同孵育时间 A β 各肽段寡聚
Fig. 3 Transmission electron microscope analyses of the six A β peptides in different time duration

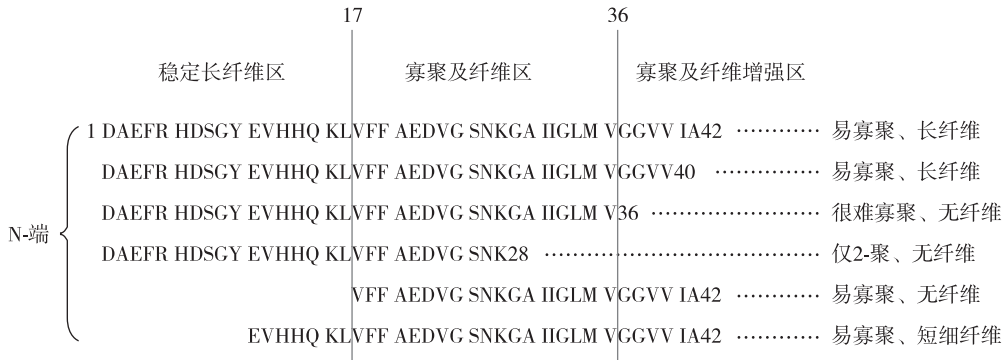


图 4 各基元序列在 A β 寡聚和纤维过程中的作用
Fig. 4 The role of motifs in the process of A β oligomerization and fibrillation

验证,但这些结论可以为 $A\beta_{1-42}$ 在 AD 中的毒性机制研究提供很好的帮助。

参考文献:

- [1] REITZ C, BRAYNE C, MAYEUX R. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(3): 137-152.
- [2] SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER M M, et al. Alzheimer's disease[J]. *The Lancet*, 2016, 388: 505-517.
- [3] FORTEA J, VILAPLANA E, ALCOLEA D, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid and phospho-tau biomarker interactions affecting brain structure in preclinical Alzheimer disease[J]. *Ann Neurol*, 2014, 76(2): 223-230.
- [4] TARASOFF-CONWAY J M, CARARE R O, OSORIO R S, et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(8): 457-470.
- [5] BENILOVA I, KARRAN E, STROOPER D B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(3): 349-357.
- [6] STRELTISOV V A, VARGHESE J N, MASTERS C L, et al. Crystal structure of the amyloid-beta p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(4): 1419-1426.
- [7] YU L, EDALJI R, HARLAN J E, et al. Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(9): 1870-1877.
- [8] AHMED M, DAVIS J, AUCCOIN D, et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(5): 561-567.
- [9] BLAINE S J W. In vitro characterization of conditions for amyloid- β peptide oligomerization and fibrillogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11612-11622.
- [10] ZHANG Y J, SHI J M, BAI C J, et al. Intra-membrane oligomerization and extra-membrane oligomerization of amyloid-beta peptide are competing processes as a result of distinct patterns of motif interplay[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 748-756.
- [11] YU F, GONG P, HU Z, et al. Cu(II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid-beta peptide on microglial activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 122.
- [12] ABELEIN A, GRASLUND A, DANIELSSON J. Zinc as chaperone-mimicking agent for retardation of amyloid beta peptide fibril formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(17): 5407-5412.
- [13] PARAVASTU A K, LEAPMAN R D, YAU W M, et al. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18349-18354.
- [14] LUHRS T, RITTER C, ADRIAN M, et al. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta (1-42) fibrils[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(48): 17342-17347.
- [15] HOYER W, GRONWALL C, JONSSON A, et al. Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(13): 5099-5104.

Dissection of the Interplay among the Motifs within Amyloid Beta Peptide in Processes of Oligomerization and Fibrillation

SHI Jingming, LI Yansong, CHEN Wenling, HE Xue, WU Tao, WU Meina

(Gene Research Laboratory Related plateau Environment and Disease, School of Medicine,

Xizang Minzu University, Shaanxi Xianyang 712082, China)

Abstract: [Purposes] β -amyloid oligomers are one of the main causes of Alzheimer's disease. Explicating the structure and function of each segment motif in the sequence of β -amyloid peptide which forms soluble oligomer and fiber was the target in this paper. [Methods] Six C- and N-terminal end of truncated β -amyloid peptides were used to analysis their oligomerization and fibrillation capability. Use Thioflavin-T (ThT) fluorescence detection, Tris-Tricine electrophoresis and transmission electron microscope (TEM) methods to clarify the role of the amino acid motifs in the process of oligomerization and fibrillation. [Findings] The results show: 1) Amino acids 37~42 can enhance $A\beta$ oligomerization and fibrillation function; 2) Amino acids 18~36 is important for oligomerization and fibrillation, but cannot lack participation of N-terminal; 3) $A\beta_{1-17}$ is necessary for the formation of long $A\beta$ fibre. [Conclusions] Amino acid sequence of β -amyloid protein can contribute different roles in the process of oligomerization and fibrillation. These research results may provide a strong reference to clarify the role of $A\beta$ toxicity in AD.

Keywords: β -amyloid peptide; truncated peptides; oligomer; fiber

(责任编辑 许 甲)