酵母朊蛋白Sup35NM的寡聚化过程研究

王艳景^{1*}, 吴奇^{1,2}

1. 香港中文大学化学系, 香港;

2. 中国科学技术大学化学物理系, 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥 230026

* 联系人, E-mail: wangyanjing@link.cuhk.edu.hk

收稿日期: 2018-04-17; 接受日期: 2018-05-14; 网络版发表日期: 2018-06-13

香港特别行政区专项基金(批准号: CUHK4042/13P, 2130349, 4053060)资助

摘要 本文研究了与神经退行性疾病相关蛋白有类似聚集行为的模型蛋白质酵母朊蛋白Sup35NM的错误折叠过程, 特别是初始的寡聚化过程. 为了延缓和阻止朊蛋白Sup35NM在磷酸盐缓冲液中(体外条件)的聚集以利研究, 在Sup35NM的N结构域第31位点处突变并修饰了一个聚合物分子PNIPAM (即蛋白质-高分子结合物Sup35NM-31m-PNIPAM). 硫代黄素T荧光光谱实验显示, 修饰延缓了Sup35NM的寡聚化, 并给出了研究寡聚化的时间窗口: 25℃时, 修饰前后分别是~10和24 h. 激光光散射实验进一步证实了修饰阻碍Sup35NM寡聚化聚集. 运用Smoluchowski模型公式, 拟合了激光光散射实验数据, 定量地给出并对比了修饰前后两个样品在聚集初期(6 h内)的寡聚体分布. 结果显示, 在引发聚集6 h后, 未修饰样品中的蛋白质单体仅剩13%, 而在PNIPAM修饰后的样品中蛋白质单体则仍占46%. 本工作作为可控、定量研究朊蛋白寡聚化提供了新思路.

关键词 蛋白质折叠, 神经退行性疾病, Sup35NM朊蛋白, 蛋白质的定点高分子修饰, 寡聚化过程

蛋白质错误折叠并最终聚集形成淀粉样纤维结构的行为与多种神经退行性疾病相关^[1,2], 包括阿尔兹海默症(Alzheimer disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease, HD)、传染性海绵状脑病等. 这给当代社会人类的健康带来巨大的威胁, 尤其对老年人的危害更为严重^[3,4]. 神经退行性疾病患者症状表现为记忆障碍、认知障碍、失语、失用, 最终生活完全无法自理^[5]. 其中, 阿尔兹海默症被称为“21世纪的瘟疫”, 在未来的40年里预计将会有超过八千万新增患者^[3]. 目前为止, 尚未发现一种能有效治愈此类神经退行性疾病的药物^[6,7]. 因此, 为了研发出更多的药物, 越来越多的人致力于研究

与神经退行性疾病相关的蛋白质的聚集机制^[8-10].

尽管不同的神经退行性疾病的临床症状和发病过程存在明显差异, 但他们有共同的特点: 病人的脑组织内都存在沉积的斑块. 进一步研究表明, 虽然这类斑块的蛋白质组成不尽相同, 但它们的主要亚显微结构都是一种具有相同染色特性的淀粉样纤维^[5,11]. 这是一种含有 β -折叠二级结构的蛋白质聚集体, 可以用硫代黄素T (thioflavin T, ThT)、刚果红等染料进行荧光染色研究^[4]. 多种因素均可以引发相应的淀粉样蛋白质经过复杂的过程, 通过不同的路径聚集最终形成淀粉样纤维结构, 如突变、浓度的增加、环境压力, 以及老龄化等^[1]. 通常来说, 淀粉样蛋白质的纤维化主要包括

引用格式: 王艳景, 吴奇. 酵母朊蛋白Sup35NM的寡聚化过程研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 662-670

Wang Y J, Wu C. Oligomerization of yeast prion Sup35NM (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 662-670, doi: 10.1360/N052018-00022

成核和生长两个过程. 首先, 少数的单体蛋白质错误折叠, 导致部分疏水基团暴露在表面. 为了增加稳定性, 不同的蛋白质分子间相互作用形成小的中间体或者称其为寡聚体. 进一步地, 蛋白质单体与寡聚体以及他们各自之间相互作用生长形成少量的 β -折叠结构, 最终形成成熟的淀粉样纤维结构^[11-13]. 本文中这两个过程分别称为蛋白质的寡聚化和纤维化.

近年来, 越来越多的证据显示淀粉样蛋白质聚集过程中形成的寡聚体具有更大的神经毒性, 很有可能是该类疾病产生的根源^[14-18]. 有学者甚至提出进一步聚集形成淀粉样纤维结构是机体的一种自我保护机制^[3]. 多种针对淀粉样蛋白质错误折叠的研究集中在整个从蛋白质错误折叠到形成淀粉样纤维的过程, 试图寻找一些化合物阻止和延缓此类聚集, 从而研发出可以治疗神经退行性疾病的药物^[19-22]. 由于淀粉样蛋白质聚集初期形成的一些毒性较大的寡聚体形态复杂, 结构不均一且具有瞬时性, 一般的实验手段(如基于硫黄素T或者刚果红染料的荧光光谱, 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)等)很难对其进行实时定性的检测^[23,24]. 虽然早在1993年, Jarrett和Lansbury^[25]就在理论上提出干扰淀粉样蛋白质聚集的第一个阶段, 即成核的过程, 是治疗阿尔兹海默症的一个策略. 但是在随后的二十多年里, 极少有研究者在实验上对淀粉样蛋白质的寡聚化聚集过程做详细的研究, 甚至大多数与神经退行性疾病直接相关的蛋白质的聚集机制尚不清楚^[7,8]. 因此, 在体外条件下首先详细地研究与神经退行性疾病相关蛋白质的寡聚化过程, 进而研发出定量可重复的方法筛选能有效减缓淀粉样蛋白质寡聚化过程的药物分子, 有望减缓或者治疗神经退行性疾病. 这将是此领域未来研究的重点.

本文采用Sup35NM作为模型蛋白质在体外条件下研究其聚集行为, 特别是聚集初期的寡聚化阶段. Sup35是酿酒酵母的翻译终止因子, 共含有N, M和C 3个结构域. 其中N结构域包含123个氨基酸单元, 决定整个蛋白质的聚集行为, 也被称为朊蛋白结构域; M结构域包含临近N结构域的120个氨基酸单元, 具有高电荷性, 增加了整个蛋白质的溶解度^[26,27]. Sup35的NM结构域可在体外生理缓冲溶液中聚集形成淀粉样纤维结构, 使其成为一个方便研究的模型蛋白, 常被用于在体外条件下研究淀粉样蛋白质的聚集行为和其中的构象变化^[28,29].

实验中, 首先在M结构域的末端引入一个含6个组氨酸的标签, 该标签可以和镍离子螯合, 以方便纯化相应的蛋白质. 为了延缓和阻止朊蛋白Sup35NM在磷酸盐缓冲液中的聚集以利研究, 在Sup35NM的N结构域的第31位点处突变得到一个半胱氨酸结构单元, 并运用巯基与双键的反应修饰了一个马来酰亚胺封端的聚N-异丙基丙烯酸酰胺(即蛋白质-高分子结合物Sup35NM-31m-PNIPAM). 前期的实验数据显示, 此种修饰抑制了Sup35NM的聚集, 并建立了一种可用于筛选药物的定量可重复的方法^[30]. 本文结合荧光光谱、TEM, 以及动态和静态光散射等检测手段, 进一步详细分析了在修饰聚合物PNIPAM前后, Sup35NM的聚集过程变化. 首先采用荧光光谱实验, 给出了寡聚化聚集(也称为迟滞期)的时间窗口, 之后运用Smoluchowski模型公式拟合了测得的寡聚化阶段的激光光散射实验数据, 定量地给出了在聚集初期的6 h内, Sup35NM修饰前后两个样品中寡聚体的分布.

1 材料与方法

1.1 试剂

LB培养基、硫酸卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、盐酸胍(Tris-HCl)、咪唑、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)、十二烷基硫酸钠、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)、异丙醇、氢氧化钠、盐酸、三(2-羧基乙基)磷盐酸盐(tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP)、ThT染料、马来酰亚胺封端的聚N-异丙基丙烯酸酰胺(M_n 2000 g/mol)等试剂购买于Sigma-Aldrich公司(美国), 未经纯化直接使用. 30%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液、考马斯亮蓝R-250等试剂购买于Bio-Rad公司(美国). Pierce BCA蛋白定量分析试剂盒和预染色的蛋白质标记物购买于Thermo Scientific公司(美国). HisTrap HP色谱柱和镍磁珠购买于GE Healthcare公司(美国). 不同孔径的膜过滤器(20, 200, 450 nm)购买于Whatman公司(美国). 超滤管(截留分子量3, 10 kD)购买于Millipore(美国). 铜网碳支持膜购买于北京新兴百瑞技术有限公司.

1.2 蛋白质的表达、纯化与浓度测量

本研究采用大肠杆菌BL21 (DE3)表达蛋白质Sup35NM或第31位点处突变成半胱氨酸的突变体蛋白质Sup35NM-31m。每一种蛋白质末端均引入了含6个组氨酸的标签, 整段基因克隆在pET28a载体质粒上导入了相应质粒的大肠杆菌在37℃下的LB液体培养基中(含有浓度为50 μg/mL的硫酸卡那霉素)生长至菌液 A_{600} 达到0.5时, 加入1 mmol/L的IPTG以诱导目标蛋白质的表达。4 h后收集细菌, 加入浓度为8 mol/L的盐酸胍破碎液(含有0.04 mol/L咪唑)破碎过夜。之后将破碎液在20000×g离心机上离心1.5 h, 上清液通过200 nm亲水性膜过滤器后, 分别用HisTrap HP色谱柱和镍磁珠提取Sup35NM和Sup35NM-31m。色谱柱提取的Sup35NM用8 mol/L盐酸胍洗脱液(含0.5 mol/L咪唑)洗脱, 最后用截留分子量为3 kD的超滤管超滤浓缩, 得到高浓度(~20 mg/mL)的蛋白质溶液样品。按照操作说明, 用Pierce BCA蛋白定量分析试剂盒测试标准溶液以及蛋白质样品在570 nm处的吸光值, 并根据标准曲线计算出蛋白质样品的体积浓度, 放置备用。

1.3 聚合物PNIPAM修饰突变体蛋白质Sup35NM-31m

关于聚合物PNIPAM修饰Sup35NM-31m的详细过程可以参考文献^[30]。简言之, 经提纯后蛋白质Sup35NM-31m仍整合在镍磁珠的表面, 此时在镍磁珠体系中加入带有马来酰亚胺末端的PNIPAM溶液以及还原剂TCEP。12℃下反应48 h后, 以缓冲溶液冲洗镍磁珠表面除去未反应的PNIPAM和TCEP, 最后用8 mol/L盐酸胍洗脱液将产物洗脱并用Ellman试剂测试所得产物的产率, 之后超滤浓缩同上。

1.4 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验

量取2 mL 30%的变性胶单体溶液(丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺质量比为19:1), 加入Tris缓冲溶液和10% SDS溶液, 之后加入APS引发剂和TEMED促凝剂, 搅拌使之混合均匀。将上述混合溶液注入预先用胶带固定的玻璃板中聚合1 h, 形成15%的下层胶。然后配置4%的上层胶, 加入梳子。将上述变性胶放入电泳槽中, 倒入电泳缓冲液。取5 μL配制好的相应蛋白质

样品, 注入胶孔, 设置电压为80 V, 室温下电泳0.5 h。待样品全部进入下层胶, 调高电压至120 V, 室温下再电泳约4 h。完成后将胶取出, 以考马斯亮蓝R-250染色10 min, 脱色液(体积比甲醇:蒸馏水:乙酸=9:9:2)脱色1 h, 放入凝胶成像仪(Bio-Rad公司)中拍照保存。

1.5 ThT荧光光谱实验

测量淀粉样蛋白质聚集体与ThT染料结合的荧光光谱实验是一种被广泛用来检测淀粉样纤维中β-折叠结构的方法^[31]。将浓缩的朊蛋白Sup35NM溶液(在浓度为8 mol/L的盐酸胍缓冲液中)稀释约200倍到磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4)中, 引发其聚集^[27]。同时加入终浓度为10 μmol/L的ThT染料, 充分混匀后, 用HITACHI F7000荧光仪测量溶液在不同时间点的荧光光谱跟踪蛋白质的聚集过程。仪器参数设置为: 狭缝宽度5 nm, 波长扫描范围460~520 nm。测量荧光发射光谱在最高峰(490 nm)处的光强值, 取3次测量的 $\bar{x}$, 并计算出SD。

1.6 TEM

用FEI CM120 TEM对蛋白质样品的聚集形态进行拍照。取相应聚集时间点的蛋白质溶液10 μL, 滴在涂有碳支持膜的铜网上, 立即放置到液氮环境中将溶液瞬间冻成冰, 之后将此铜网一起转移到真空干燥箱中约3 h(此过程是模拟冷冻电子显微镜制样)^[32]。待溶剂升华完全后, 在铜网上滴一滴1%的醋酸铀染色1 min, 用吸水纸将其吸走, 之后用蒸馏水洗染色的样品两次, 自然挥发干, 即可用于TEM拍照。

1.7 动态和静态光散射

激光光散射是一种测量高分子溶液性质的主要手段, 详细的理论可以在其他文献中找到参考^[33-35]。实验采用ALV-5000激光散射仪(ALV公司, 德国), 配以He-Ne激光光源(波长632.8 nm, 输出功率22 mW)。所有待测量的溶液均预先以孔径为220 nm的亲水性膜除尘。

在静态光散射中, 通过测量给定角度的散射光强, 使用Zimm关系(公式(1))可以得到测量对象的重均分子量(M_w), 根均方旋转半径($\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}$ 或写作 $\langle R_g \rangle$)和第二维里系数(A_2)

$$\frac{KC}{R_{90}(q)} \approx \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle_z q^2 \right) + 2A_2 C, \quad (1)$$

式中, $K=4\pi^2 n^2 (dn/dC)^2 / (N_A \lambda_0^4)$, $q=4\pi n \sin(\theta/2) / \lambda_0$, 其中 N_A , dn/dC , n , θ , λ_0 分别为阿伏伽德罗常数、特性折光指数增量、溶剂折光指数、散射角以及入射光在真空中的波长. 特别地, 当待测物质浓度极小, 散射角度极低时, 公式(1)可以简化为:

$$\frac{R_{90}(q)}{KC} \approx M_w, \quad (2)$$

值得注意的, $C=W/V$, 而 $M_w=(\sum W_i M_i)/W$, 因此, $\langle I_s(q \rightarrow 0) \rangle \propto \sum W_i M_i = \sum n_i M_i^2$. 这里 W_i , n_i 和 M_i 分别为第 i 个散射体的质量, 数量以及摩尔质量. 即 $\langle I_s(q \rightarrow 0) \rangle \propto M^2$. 上述论证表明光散射技术对蛋白质聚集非常敏感.

在动态光散射中, 测得的归一化光强-光强时间相关函数 $G^{(2)}(q, t)$ 与归一化电场-电场时间相关函数 $g^{(1)}(q, t)$ 通过 Siegert 关系式联系在一起

$$G^{(2)}(q, t) = A \left[1 + \beta |g^{(1)}(q, t)|^2 \right], \quad (3)$$

这里 A 是测量基线, β 是相关因子, 与检测器光学结构有关. 对于一个多分散体系, $|g^{(1)}(q, t)|$ 与特征线宽分布 $G(\Gamma, q)$ 存在以下关系式:

$$|g^{(1)}(q, t)| = \int G(\Gamma, q) e^{-\Gamma t} d\Gamma, \quad (4)$$

其中, $G(\Gamma, q)$ 可以通过 ALV 公司提供的 CONTIN 程序对每次测得的 $G^{(2)}(q, t)$ 作 Laplace 反演得到. 对于一个纯粹的扩散过程来说, Γ 对 q^2 呈正比, 其斜率为散射体的平均平动扩散系数 ($\langle D \rangle$). 被测体的流体力学半径 (R_h) 可以进一步通过斯托克斯-爱因斯坦公式获得, 即 $R_h = k_B T / (6\pi\eta D)$, 其中 k_B , T 与 η 分别为玻尔兹曼常数, 绝对温度以及溶液黏度. 本文所有的激光光散射实验均在 25°C 进行.

2 结果与分析

2.1 聚合物 PNIPAM 修饰 Sup35NM-31m

Lindquist 课题组^[36]曾系统地研究了朊蛋白 Sup35NM 的聚集机制. 通过在 NM 结构域的多个不同位点处突变表达半胱氨酸并修饰一个荧光分子苣, 证明了朊蛋白 Sup35NM 在聚集过程中第 31 和 96 位点附近的氨基酸存在分子间相互作用, 由此提出了一个被广泛接受的头对头尾对尾式的 β -螺旋结构模型^[36]. 基于 Lindquist 课题组的研究成果, 本课题组设计在

Sup35NM 的第 31 位点处修饰唯一一个聚合物分子 PNIPAM, 利用其提供的空间位阻阻碍分子间相互作用, 进而阻碍上述头对头尾对尾式的 β -螺旋结构的形成, 以达到减缓和阻止朊蛋白 Sup35NM 聚集的目的.

实验中, 先通过基因突变在 Sup35NM 的第 31 位点突变表达出一个半胱氨酸. 这种突变本身已被 Lindquist 课题组证明不会对 Sup35NM 的聚集产生影响. 之后运用巯基与马来酰亚胺的点击反应修饰一个聚合物分子 PNIPAM. 反应过程描述如图 1(A) 所示. 上述反应在镍磁珠上进行以利于后续产物的纯化. 反应完成后, 先用 4 mol/L 的盐酸胍缓冲溶液将未反应的 PNIPAM 分子除去, 再将反应产物洗脱下来. 产物以 SDS-PAGE 实验进行表征, 如图 1(B) 所示. 结果表明, 经聚合物 PNIPAM 修饰后的产物条带变宽并且有明显滞后的现象, 证明蛋白质 Sup35NM 上已经成功修饰了 PNIPAM 分子.

2.2 ThT 荧光光谱实验结果

ThT 染料可以有效地与 β -折叠结构结合, 从而发射出特定的荧光光谱. 此方法可用来检测淀粉样蛋白质聚集过程中 β -折叠结构的生成. 特别需要指出, 此前研究朊蛋白 Sup35NM 的聚集皆是直接将 Sup35NM 溶解在高浓度的盐溶液中(尿素或盐酸胍)以达到完全溶解状态(溶液中的蛋白质全部以单体的形式存在), 随后直接将浓缩的蛋白质盐溶液稀释至磷酸盐缓冲液中引发聚集. 此前用激光光散射的方法证明即使在高浓度的盐酸胍缓冲液中, 仍然有极少数的聚集体, 而它们很可能成为引发后续聚集的中间体^[37]. 如此, 检测聚集过程将无法从最初的阶段开始. 为了避免上述干扰, 预先将所有蛋白质样品的盐溶液缓慢地通过一个孔径为 20 nm 的膜过滤器. 此方法可有效地除尽存在的少量聚集体^[37], 从而确保蛋白质聚集从最初全是单体的状态开始. 图 2(A) 中 ThT 荧光实验结果所示, 在引发聚集后的 10 h 内, 朊蛋白 Sup35NM 样品中无 β -折叠结构生成, 即在本实验条件下其聚集迟滞期约为 10 h. 而在结合物 Sup35NM-31m-PNIPAM 的溶液中, 24 h 后才有 β -折叠结构开始生成. 这里需要说明的是, 游离的 PNIPAM 本身并不会对蛋白质聚集溶液的荧光光谱产生影响. 进一步地, 修饰前后两种样品在聚集 80 h 后的 TEM 结果显示, Sup35NM 样品中(图 2(B))有细长的淀粉样纤维结构生成而 Sup35NM-31m-PNIPAM 样品中聚集体(图 2(C))多为无规形貌. 即在相同的条件下,

图1 蛋白质高分子结合物合成路线图及合成产物的检测

A: 在Sup35NM-31m上修饰马来酰亚胺末端的PNIPAM的合成路线图; B: 考马斯亮蓝R-250染色的凝胶电泳实验结果

PNIPAM的修饰不仅使得朊蛋白Sup35NM的聚集迟滞期延长超过2倍, 而且在相同的时间内无法聚集成淀粉样纤维结构。总之, 聚合物PNIPAM对朊蛋白Sup35NM的定点修饰阻碍和减缓了其聚集, 此结果证实了Lindquist课题组提出的朊蛋白Sup35NM的聚集模型以及本课题组实验假设, 即在Sup35NM的N结构域第31位点处引入PNIPAM分子, 可阻碍在聚集过程中该位点及附近氨基酸的相互作用, 进而降低了此蛋白质的聚集动力学。又因为迟滞期生成的寡聚体在神经退行性疾病中表现出更大的神经毒性, 因此深入研究寡聚化聚集过程, 从而找到延缓甚至阻止寡聚化的方法对疾病治疗极其关键。

2.3 激光光散射研究Sup35NM和Sup35NM-31m-PNIPAM的寡聚化聚集过程

基于上述ThT荧光实验, 确定了朊蛋白Sup35NM和结合物Sup35NM-31m-PNIPAM的寡聚化聚集时间窗口。由于寡聚化阶段极少有 β -折叠结构生成, 表现为荧光光强值基本无增长, 所以只通过荧光实验无法有效地跟踪寡聚化聚集的过程。据了解, 激光光散射是一种对高分子溶液中聚集体的生成十分敏感的实验技术。散射光强的强度与被测物质的摩尔质量的平方成正比。一旦有少量的聚集体生成, 溶液的光强就会出现明显的增长。因此, 采用激光光散射实验方法跟踪了以上两种PNIPAM修饰前后样品的寡聚化聚集过程, 结果如图3所示。从引发聚集开始, 朊蛋白Sup35NM溶液的光强迅速增长, 而结合物Sup35NM-31m-PNIPAM溶液的光强增长较慢。在24 h后, 前者光强增长约14倍, 而后者光强只增长了约8倍。值得注意的是, 从荧光实

图2 荧光光谱实验检测蛋白质聚集过程及蛋白质聚集物扫描电子显微镜图

A: Sup35NM, Sup35NM-31m-PNIPAM以及PNIPAM溶液稀释200倍到PBS溶液中后溶液ThT荧光强度随时间变化图。最终的蛋白质浓度为 $3 \mu\text{mol/L}$, ThT浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$; 引发聚集80 h以后的Sup35NM (B)和Sup35NM-31m-PNIPAM (C)

验(图2A)可知, Sup35NM样品聚集的前12 h内溶液中几乎无 β -折叠结构生成, 之后开始生成越来越多较大的聚集体。这导致了图3中朊蛋白Sup35NM溶液的光强在聚集12 h以后出现较大的波动。相对地, 结合物Sup35NM-31m-PNIPAM的光强增长则较为稳定。上述光散射实验结果与荧光实验共同表明了Sup35NM-31m-PNIPAM具有一个减缓的聚集过程。

2.4 Smoluchowski公式模拟朊蛋白Sup35NM以及Sup35NM-31m-PNIPAM寡聚化过程

总结上述实验结果, 先通过ThT荧光光谱实验检测到两种蛋白质样品的寡聚化聚集时间窗口, 进一步利用激光光散射实验验证在聚集的寡聚化阶段,

图3 引发聚集以后归一化散射光强随时间变化关系(网络版彩图)

Sup35NM-31m-PNIPAM的聚集速度低于Sup35NM. 为了更详细地了解聚集初期的变化过程, 运用Smoluchowski模型公式拟合部分激光光散射实验数据, 并给出了聚集初期的前6 h内各自样品中寡聚体个数的变化与分布.

在Smoluchowski理论中^[38-40], 假设(i) 对于任意两个寡聚体, 其聚集速率常数 K_{ij} 保持一致; (ii) 聚集过程不可逆; (iii) 3个及以上寡聚体的聚集因概率极低而可忽略不计. 基于以上假设, 有以下关系式:

$$\frac{d}{dt}N_k(t) = \frac{1}{2} \sum_{i+j=k} K_{ij}N_i(t)N_j(t) - N_k(t) \sum_{j=1}^{\infty} K_{k,j}N_j(t), \quad (5)$$

式(5)中, $N_k(t)$ 为聚集数为 k 的寡聚体的数量浓度. 进一步地, 式(5)可以重写为:

$$\frac{d}{d\tau}n_k(\tau) = \frac{1}{2} \sum_{i+j=k} n_i(\tau)n_j(\tau) - n_k(\tau) \sum_{j=1}^{\infty} n_j(\tau), \quad (6)$$

式中, $\tau = [ak_s N_1(0)]t = \gamma_s t$, 且 $\gamma_s = ak_s N_1(0)$ 为常数, 其中 α 为附着概率, k_s 为与黏度和温度相关的常数. 式(6)可得解:

$$n_i(\tau) = (\tau/2)^{i-1} / (1 + \tau/2)^{i+1}. \quad (7)$$

根据光散射理论, 在足够低的浓度与散射角下,

$$\begin{aligned} \frac{\langle I_t \rangle}{\langle I_0 \rangle} &= \frac{M_w(t)}{M_1} = \frac{\sum_i w_i M_i}{M_1} \\ &= \frac{\sum_i [n_i i M_1 / (1 \times M_1)] \times i M_i}{M_1} \\ &= \sum_i i^2 n_i = 1 + \tau, \end{aligned} \quad (8)$$

式中 w_i 为 i 聚体的归一化质量浓度, M_1 为蛋白质单体的摩尔质量. 由公式(8)可知, 光强比与时间成线性关系. 如图4所示, 拟合两种样品的光散射数据的斜率可得: $\gamma_s(\text{Sup35NM}) = 0.575/\text{h}$, $\gamma_s(\text{Sup35NM-31m-PNIPAM}) = 0.158/\text{h}$. 又知在298.15K的磷酸盐缓冲液中, $k_s = 8k_B T / 3\eta = 7.4 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1} \text{s}^{-1}$, 即得到 $\alpha(\text{Sup35NM}) = 7.3 \times 10^{-9}$, $\alpha(\text{Sup35NM-31m-PNIPAM}) = 2 \times 10^{-9}$. 由此可知, 修饰过聚合物PNIPAM的胰蛋白Sup35NM聚集的附着概率下降约73%. 此模型拟合结果定量地说明了连接聚合物PNIPAM分子在Sup35NM的第31位点处可以显著地阻碍其聚集行为.

进一步地, 可以通过公式(7)估算出在给定的时间点上两种样品中各自的寡聚体的数量分布, 进而通过关系式 $w_i = i \times n_i$, 计算出各个寡聚体所占质量分数. 其结果如图5所示. 在6 h以后, Sup35NM中只有13.4%的蛋白质以单体形式存在, 而17%, 16.2%, 13.6%的蛋白质以二聚体, 三聚体和四聚体的形式, 以及一部分更高聚体的形式存在. 于此同时, 在Sup35NM-31m-PNIPAM中, 依然有46.4%的蛋白质以单体的形式存在, 二聚体、三聚体、四聚体所占百分比分别为29.6%, 14.1%, 6%. 经PNIPAM修饰后的Sup35NM单体的减少

图4 引发聚集以后归一化散射光强度随时间变化关系的拟合结果(网络版彩图)

红色实线是根据公式(8)拟合所得, $R^2 \geq 0.98$

图5 Smoluchowski公式计算所得蛋白质聚集在不同时间点上寡聚体的质量分布

A: Sup35NM; B: Sup35NM-31m-PNIPAM. 图中黑色虚线仅作参考. 插图显示了蛋白质单体、二聚体、三聚体和四聚体质量分数随时间的变化

速率与寡聚体(聚合数在1~10)的增长速率明显减缓, 更进一步定量地证明了PNIPAM修饰对朊蛋白Sup35NM聚集的阻碍作用.

3 结论

本文采用了一种能在体外聚集成淀粉样纤维结构的酵母朊蛋白Sup35NM作为模型蛋白, 提供了一种系统地研究淀粉样蛋白质聚集成淀粉样纤维结构的方法, 特别是其寡聚化聚集的过程. 因实验方法的限制,

很少有研究者对淀粉样蛋白的寡聚化聚集过程进行详细研究. 本文不仅描述了一种用聚合物定点修饰来调控蛋白质聚集行为的方法, 而且通过结合荧光光谱和激光光散射实验技术, 给出了研究寡聚化的时间窗口, 并运用Smoluchowski模型公式定量地分析了6 h内朊蛋白Sup35NM和其结合物Sup35NM-31m-PNIPAM的寡聚体分布. 综合以上结果, PNIPAM的修饰很大程度上阻碍了Sup35NM的聚集. 此方法可以为研究其他与神经退行性疾病直接相关的蛋白质聚集提供参考, 也有望应用于体外筛选药物分子.

参考文献

- 1 Lotz G P, Legleiter J. The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease. *J Mol Med*, 2013, 91: 653–664
- 2 Rambaran R N, Serpell L C. Amyloid fibrils. *Prion*, 2008, 2: 112–117
- 3 Knowles T P J, Vendruscolo M, Dobson C M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 384–396
- 4 Zganec M, Zerovnik E. Amyloid fibrils compared to peptide nanotubes. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 2944–2952
- 5 Soto C, Estrada L D. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*, 2008, 65: 184–189
- 6 Berry D B, Lu D, Geva M, et al. Drug resistance confounding prion therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E4160–E4169
- 7 Liu Y, Wei H, Wang J, et al. Effects of randomizing the Sup35NM prion domain sequence on formation of amyloid fibrils *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353: 139–146
- 8 Martin J B. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med*, 1999, 340: 1970–1980
- 9 Dobson C M. Protein folding and misfolding. *Nature*, 2003, 426: 884–890
- 10 Knowles T P J, Vendruscolo M, Dobson C M. The physical basis of protein misfolding disorders. *Phys Today*, 2015, 68: 36–41
- 11 Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4: 49–60
- 12 Yoshimura Y, So M, Yagi H, et al. Ultrasonication: an efficient agitation for accelerating the supersaturation-limited amyloid fibrillation of proteins. *Jpn J Appl Phys*, 2013, 52: 07HA01
- 13 Chatani E, Goto Y. Structural stability of amyloid fibrils of β 2-microglobulin in comparison with its native fold. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1753: 64–75
- 14 Chiti F, Dobson C M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 333–366

- 15 Ross C A, Poirier M A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2004, 10: S10–S17
- 16 Fradinger E A, Monien B H, Urbanc B, et al. C-terminal peptides coassemble into A β 42 oligomers and protect neurons against A β 42-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 14175–14180
- 17 Lee S, Zheng X, Krishnamoorthy J, et al. Rational design of a structural framework with potential use to develop chemical reagents that target and modulate multiple facets of Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 299–310
- 18 Bieschke J, Herbst M, Wiglenda T, et al. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat Chem Biol*, 2011, 8: 93–101
- 19 Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, et al. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6739–6744
- 20 Blanchard B J, Chen A, Rozeboom L M, et al. Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14326–14332
- 21 Young L M, Saunders J C, Mahood R A, et al. Screening and classifying small-molecule inhibitors of amyloid formation using ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Nat Chem*, 2015, 7: 73–81
- 22 Feng B Y, Toyama B H, Wille H, et al. Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 197–199
- 23 Carballo-Pacheco M, Strodel B. Advances in the simulation of protein aggregation at the atomistic scale. *J Phys Chem B*, 2016, 120: 2991–2999
- 24 Teoh C L, Su D, Sahu S, et al. Chemical fluorescent probe for detection of A β oligomers. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 13503–13509
- 25 Jarrett J T, Lansbury P T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 1993, 73: 1055–1058
- 26 Narayanan S, Walter S, Reif B. Yeast prion-protein, Sup35, Fibril formation proceeds by addition and subtraction of oligomers. *ChemBioChem*, 2006, 7: 757–765
- 27 Glover J R, Kowal A S, Schirmer E C, et al. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*, 1997, 89: 811–819
- 28 Serio T R, Cashikar A G, Moslehi J J, et al. [41] yeast prion [ψ^+] and its determinant, sup35p. *Methods Enzymol*, 1999, 309: 649–673
- 29 Balbirnie M, Grothe R, Eisenberg D S. An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 2375–2380
- 30 Wang Y, Wu C. Quantitative study of the oligomerization of yeast prion Sup35NM proteins. *Biochemistry*, 2017, 56: 6575–6584
- 31 Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804: 1405–1412
- 32 Zhao H, Chen Q, Hong L, et al. What morphologies do we want?—TEM images from dilute diblock copolymer solutions. *Macromol Chem Phys*, 2011, 212: 663–672
- 33 Chu B. *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*. San Diego: Academic Press, 1991
- 34 Berne B J, Pecora R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Mineola: Courier Dover Publications, 2000
- 35 Iwao T. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*. New York: Wiley, 2002
- 36 Krishnan R, Lindquist S L. Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature*, 2005, 435: 765–772
- 37 Diao S, Zhao H, Wang W M, et al. Preparation of true solutions of monomeric amyloidogenic protein/peptide: a critical prerequisite for aggregation kinetic study. *Sci China Chem*, 2012, 55: 118–124
- 38 Modler A J, Gast K, Lutsch G, et al. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers—a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol*, 2003, 325: 135–148
- 39 Feder J, Jøssang T, Rosenqvist E. Scaling behavior and cluster fractal dimension determined by light scattering from aggregating proteins. *Phys Rev Lett*, 1984, 53: 1403–1406
- 40 Dubovskii P B. *Mathematical theory of coagulation*. Seoul: Research Institute of Mathematics, Global Analysis Research Center, Seoul National University, 1994

Oligomerization of yeast prion Sup35NM

WANG YanJing¹ & WU Chi^{1,2}

1 Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China;

2 Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

We have studied the misfolding process of a neurodegenerative disease-related protein, yeast prion Sup35NM, especially the initial oligomerization process. To slow down the aggregation rate of Sup35NM in phosphate buffer saline *in vitro*, we conjugated a commercial available maleimide terminated-poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) molecule at the specific 31st residue site on Sup35NM by site-directed mutagenesis and thiol-ene click chemistry, which results in a Sup35NM-31m-PNIPAM conjugate. The aggregation process of Sup35NM was hindered after modification by PNIPAM at 25°C. The ThT fluorescence assay provided a time window for studying the oligomerization process (or lag phase) of Sup35NM (~10 h) and the Sup35NM-31m-PNIPAM conjugate (~24 h) based on the onset of the fluorescence intensity. Further, the results of LLS confirmed the inhibition effect of PNIPAM modification on the oligomerization of Sup35NM due to its high sensitivity on the small aggregates. Finally, the Smoluchowski coagulation equation was adopted to analyze the data from laser light scattering, which provides us quantitative results on the lag phase kinetics and oligomer distribution of the two samples during the initial 6 h upon aggregation. The results show that there only exists ~13% monomers in the sample of the Sup35NM at 6 h after initiating the protein association process, while nearly half of the protein chains exist as monomers for the Sup35NM-31m-PNIPAM conjugate. In summary, the current work provides a controllable and quantitative way to study the oligomerization behavior of the amyloidogenic proteins.

protein folding, neurodegenerative diseases, prion Sup35NM, site-specific modification of proteins by polymers, oligomerization

doi: [10.1360/N052018-00022](https://doi.org/10.1360/N052018-00022)