

# 脂质体包裹荧光受体方法研究 $\alpha$ -突触核蛋白在磷脂膜上的结构和动态特征\*

马东飞<sup>1)3)</sup> 侯文清<sup>1)3)</sup> 徐春华<sup>1)</sup> 赵春雨<sup>2)3)</sup> 马建兵<sup>1)</sup> 黄星楦<sup>1)3)</sup>  
贾棋<sup>1)3)</sup> 马璐<sup>1)</sup> 刘聪<sup>2)3)</sup> 李明<sup>1)3)</sup> 陆颖<sup>1)3)†</sup>

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2) (中国科学院上海有机化学研究所, 中国科学院生物与化学交叉研究中心, 上海 200032)

3) (中国科学院大学, 北京 100049)

(2019年10月21日收到; 2019年11月10日收到修改稿)

$\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn) 在帕金森病的发病机理中起着关键的作用, 因而近年来受到了越来越广泛的关注.  $\alpha$ -syn 在膜上的动力学过程对理解其功能至关重要. 本文使用基于脂质体的单分子荧光衰减方法——LipoFRET, 首次对较高浓度下  $\alpha$ -syn 与磷脂膜的相互作用的动态过程进行了单分子层面上的研究. 研究发现, 在溶液中  $\alpha$ -syn 浓度升高时, 其中央 NAC 区域可离开磷脂膜表面进入水相中; 而 N 端部分位于膜表面内的位置变浅, 并有更高的概率脱离膜表面进入溶液中. 利用单分子荧光成像对  $\alpha$ -syn 解离的观察则发现, 随着溶液中的  $\alpha$ -syn 浓度升高, 脂质体上的  $\alpha$ -syn 解离速率加快. 因此高浓度下,  $\alpha$ -syn 在膜上各区域垂直位置变化促进了蛋白从膜上的解离. 结合 LipoFRET 的实验结果可以推断,  $\alpha$ -syn 的解离可能是由于不同的  $\alpha$ -syn 分子膜作用位点互相竞争而导致的解离. 这样的特征, 可能是体内环境中影响  $\alpha$ -syn 控制其聚集的重要性质.

**关键词:**  $\alpha$ -突触核蛋白, 荧光共振能量转移, 解离, 蛋白-膜相互作用

**PACS:** 87.14.ep, 87.15.H-, 87.15.hg, 87.15.kt

**DOI:** 10.7498/aps.69.20191607

## 1 引言

$\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn) 是存在于神经系统突触前末梢与核周的一种可溶性蛋白.  $\alpha$ -syn 的研究近年来备受关注<sup>[1-4]</sup>, 它与神经退行性疾病存在密切的关联, 是帕金森病患者脑部病理性特征路易小体的主要组成部分<sup>[5,6]</sup>, 其生理功能到目前为止仍不明确. 但有研究者认为  $\alpha$ -syn 与神经可塑性及突触囊泡的释放有关<sup>[2,7]</sup>.

$\alpha$ -syn 由 140 个氨基酸残基构成, 其 N 端 1-95 残基在磷脂膜的存在下容易形成两亲性的  $\alpha$ -螺旋,

因而是该蛋白与膜相互作用的主要位置. 而 C 端 (96-140) 在生理条件下则携带大量的负电荷, 一般认为此区域不与磷脂膜相互作用而游离在水相中<sup>[8,9]</sup>.  $\alpha$ -syn 的 C 端被认为是其结合金属离子与其他配体的重要区域<sup>[10,11]</sup>. 在蛋白的中央 (61-95 残基) 是蛋白的 NAC 区域, 该区域与  $\alpha$ -syn 的聚集行为密切相关<sup>[7,12]</sup>. 在水溶液中,  $\alpha$ -syn 是舒展的无规结构<sup>[13]</sup>, 结合至膜上之后, N 端则形成富含  $\alpha$ -螺旋的结构<sup>[14]</sup>. 关于  $\alpha$ -syn 在膜上的构象, 有研究者认为,  $\alpha$ -syn 以 37-45 残基为分界, 在膜上形成中央断开的两段螺旋结构<sup>[8]</sup>; 也有研究者认为  $\alpha$ -syn 的 1-95 残基在膜上形成一整段较长的  $\alpha$ -螺旋<sup>[9]</sup>.

\* 国家自然科学基金 (批准号: 11974411, 11834018, 91753104, 11574381)、中国科学院前沿重点研究计划 (批准号: QYZDJ-SSW-SYS014) 和中国科学院青年创新促进会 (批准号: 2017015) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: [yinglu@iphy.ac.cn](mailto:yinglu@iphy.ac.cn)

进一步的研究指出,这两种构象在脂质体上均存在,而其比例可能受到膜曲率的影响<sup>[15]</sup>.  $\alpha$ -syn 与含有负电荷的磷脂双层膜(如含有 PA, PS, PG 等)具有较强的相互作用<sup>[16,17]</sup>.

关于  $\alpha$ -syn 与磷脂膜作用的细节,此前已有一些研究,一般是利用中子反射、色氨酸荧光的重原子淬灭等方法进行.一种观点认为  $\alpha$ -syn 的 N 端螺旋插入磷脂膜内 0.9—1.4 nm 处<sup>[18]</sup>,或是距离磷脂双分子层中心 0.9—1.1 nm<sup>[19]</sup>;也有研究者得出了  $\alpha$ -syn 仅位于磷脂膜头部的结论<sup>[20]</sup>.然而这些结果均是采用系综与时间平均的方法得出的,并未反映  $\alpha$ -syn 在膜当中的动态过程.此前,本课题组开发了 LipoFRET 方法,在单分子层面对  $\alpha$ -syn 与膜的相互作用进行了研究<sup>[21]</sup>,结果表明,  $\alpha$ -syn T72 位点附近的区域处于膜表面附近.而 K10 位点附近的区域可深入膜中,并且在几个不同深度之间做缓慢的运动.

到目前为止,有一些研究指出,  $\alpha$ -syn 可形成寡聚体并对膜产生破坏<sup>[1,22–24]</sup>,或者磷脂膜的存在有可能起到降低聚集的浓度阈值(可低至 nM 级别)的作用<sup>[25]</sup>.这有可能是导致帕金森病发生的重要因素.但尚未有文献报道在寡聚浓度条件下的  $\alpha$ -syn 与膜,以及寡聚过程启动初期  $\alpha$ -syn 分子之间相互作用的单分子水平上的动态细节.而单分子荧光方法在研究生物大分子的动态过程中具有独特的优势<sup>[26,27]</sup>.为了探究一定浓度下  $\alpha$ -syn 在磷脂膜上的行为与单分子浓度水平上的区别,本文采用了一种基于脂质体的单分子荧光衰减方法——LipoFRET,以及单分子荧光成像的方法研究了溶液中存在较高浓度的  $\alpha$ -syn 时,其与磷脂膜之间相互作用的变化.结果表明,在浓度 50 nM (1 M = 1 mol/L) 的  $\alpha$ -syn 存在时,  $\alpha$ -syn 的 NAC 区域可从膜表面位置脱离并进入溶液中,而 N 端第一螺旋位于膜内的概率减小且深度变浅,并有较大的概率脱离膜表面进入溶液中.这种变化促进了  $\alpha$ -syn 从膜上的解离.我们认为高浓度的情况下  $\alpha$ -syn 之间对磷脂膜结合区域的竞争性占据是导致高浓度促进  $\alpha$ -syn 从膜上的解离的原因.

## 2 实验材料、原理与方法

### 2.1 LipoFRET 方法的原理

LipoFRET 是单个荧光供体对包封在脂质体

中的多个淬灭剂分子(作为荧光受体)的共振能量转移<sup>[21]</sup>.在同一时刻,供体对任意一个受体均有发生能量转移的概率,其速率与各自距供体的距离有关.最终的能量转移总速率是所有能量转移速率的总和<sup>[21,28,29]</sup>,可以写成

$$k_t = \frac{1}{\tau_D} \sum_{i=1}^N \left( \frac{r_{0i}}{r_i} \right)^6, \quad (1)$$

其中,  $k_t$  为总的能量转移速率;  $\tau_D$  为荧光供体在无受体情况下的荧光寿命;  $r_{0i}$  为供体对第  $i$  个受体分子的 Förster 特征距离,对于单一组分的淬灭剂而言,(1)式中的  $r_{0i}$  均为相同的值  $r_0$ ;  $r_i$  为供体与第  $i$  个受体分子的空间距离.于是,能量传递效率  $E_T$  可写为

$$E_T = \frac{k_t}{k_t + \tau_D^{-1}}. \quad (2)$$

供体的相对亮度由  $F/F_0 = 1 - E_T$  决定,其中  $F$  为供体在有淬灭剂存在时的亮度,  $F_0$  为供体在无淬灭剂时的亮度.

对于膜蛋白来说,其荧光标记位点距离膜外表面越近,或在膜中的位置越深,标记在膜蛋白上的荧光基团距离淬灭剂越近,能量转移效率越高,荧光基团的相对亮度  $F/F_0$  越低.LipoFRET 就是利用对荧光基团亮度的测量来监测膜蛋白特定位置的垂直运动的(图 1(a)).

实验中,采用台盼蓝作为淬灭剂,其与  $\alpha$ -syn 上标记的荧光 Alexa Fluor 555 (Alexa 555) 之间的相对亮度与 Alexa 555 到脂质体磷脂膜内表面上的距离之间的关系如图 1(b) 所示.

### 2.2 LipoFRET 的实验步骤

LipoFRET 实验包括制备包封台盼蓝的脂质体以及荧光观测两部分.

#### 1) 脂质体的制备过程

首先,将所用磷脂以 2 mg/mL 的浓度溶解在玻璃瓶中的氯仿与甲醇的混合液当中并振荡均匀,其中氯仿与甲醇的总体积比为 2:1.本文中所用的脂质体磷脂组分为 70% DOPC, 30% DOPA, 0.1% 的 16:0 Biotinyl-cap PE (质量百分比).接着,将玻璃瓶敞口放置于真空干燥器中,抽真空过夜以抽干溶剂.此时,磷脂应在瓶壁上形成一薄层.然后,以每毫升 0.5—1 mg 磷脂的比例,在瓶中加入 5 mM (或 2.5 mM) 台盼蓝溶液,并将玻璃瓶封好在摇床

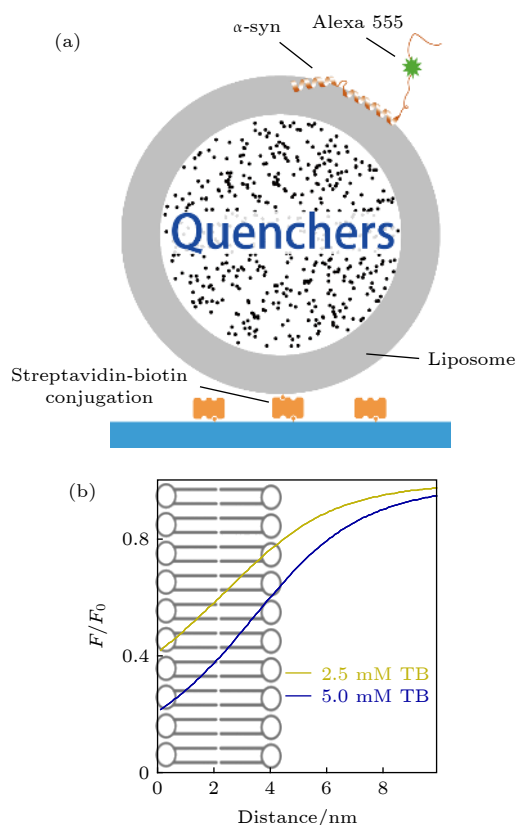


图 1 LipoFRET 方法 (a) LipoFRET 的实验体系示意图; (b) LipoFRET 的距离-相对亮度曲线, 其中淬灭剂为台盼蓝, 所用的荧光分子为 Alexa Fluor 555 (Alexa 555), 距离是指荧光基团到脂质体磷脂双层膜的内表面的距离, 曲线分别对应包封 2.5 mM (上方曲线) 及 5 mM (下方曲线) 台盼蓝的脂质体.

Fig. 1. The LipoFRET method: (a) The schematic picture of LipoFRET experiment; (b) the relationship between distance from the inner surface of the liposome lipid bilayer and relative intensity  $F/F_0$ . The quencher used here is trypan blue and the fluorophore is Alexa Fluor 555 (Alexa 555). The curves correspond to liposomes encapsulating 2.5 mM (above) and 5 mM (bottom) trypan blue.

上振荡 1 h. 此时瓶中磷脂形成了大小不均一的脂质体悬浮液. 随后, 将液体转移至塑料的小离心管中, 放入液氮中将液体速冻, 接着转移至 37 °C 的水浴中解冻, 反复冻融 5 个循环, 再使用挤出器 (Extruder, 购于 Avanti Polar Lipids) 将溶液来回挤压通过孔径为 100 nm 的聚碳酸酯膜. 收集制备好的脂质体. 接下来, 使用填料为 Sephadex G-25 的脱盐柱进行凝胶过滤, 将脂质体从未包封的台盼

蓝中分离出来; 或将溶液稀释 10 倍后, 采用规格为 100 kD 的超滤离心管反复进行超滤, 控制转速与离心时间, 每次留下约一半的液体, 并采用缓冲液补充至原体积, 直到将未包封的台盼蓝稀释至较低水平.

在制备包封台盼蓝的脂质体的同时, 应制备包封实验用缓冲液 (10 mM PBS, pH = 7.4, 0.9% NaCl) 的脂质体, 用于测定  $F_0$  的值.

## 2) LipoFRET 荧光观测的步骤

制作可供进液与排液、适合装载在全内反射荧光显微镜上的样品腔室. 其中朝向镜头的盖玻片厚度为 0.17 mm. 盖玻片朝向腔室内部的一面预先修饰 mPEG 以防止实验中蛋白的非特异性吸附, 同时亦修饰 Biotin-PEG 以供脂质体向玻片表面的连接.

实验装置采用以全内反射荧光显微镜和 EMCCD 为基础的双通道荧光共振能量转移观测装置<sup>[30–32]</sup>, 但需要将全内反射场的角度调整为“赝全内反射 (Pseudo-TIRF)<sup>[33]</sup>”的程度, 以避免光强在脂质体直径尺度内的衰减而带来上下光强不一致的情况. 使用 ImageJ 等软件记录及分析光强数据.

实验中, 首先向腔室中注入缓冲液以润洗玻片表面. 接着, 注入浓度为 0.01 mg/mL 的 Streptavidin 溶液, 待其反应 5–10 min 后, 冲去多余的 Streptavidin. 将包封有台盼蓝的脂质体稀释注入腔室, 反应约 2 min, 再注入一些脂质体以补充反应消耗. 进而, 向腔室中注入标记 Alexa 555 的  $\alpha$ -syn ( $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 或  $\alpha$ -syn K10C-Alexa 555,  $\alpha$ -syn 的氨基酸序列见表 1), 待视野中 Alexa 555 发出的荧光点数量合适, 则以 50 ms/帧的曝光时间对视野进行录像, 以记录  $\alpha$ -syn 在低浓度下的单体行为. 记录足够的数量后, 向腔室中注入 50 nM 未标记荧光的  $\alpha$ -syn (wt- $\alpha$ -syn), 以提高  $\alpha$ -syn 的总浓度, 并继续录像以记录脂质体上的标记 Alexa 555 的  $\alpha$ -syn 在总浓度较高的情况下的行为. 包封台盼蓝的脂质体的实验完成后, 立即进行包封缓冲液的脂质体的实验, 实验步骤与前述相同, 以记录和测

表 1  $\alpha$ -syn 的氨基酸序列  
Table 1. Sequences of  $\alpha$ -syn.

名称	氨基酸序列(1–140)
Human	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTVNMGGA
$\alpha$ -synuclein	VVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPAA



定  $F_0$  的值. 由于 LipoFRET 实验中关心的是相对亮度  $F/F_0$  的值, 因此在同一样品的同组实验当中, 需要保证包封缓冲液及台盼蓝的脂质体上测试的实验条件完全一致.

使用图 1(b) 中的亮度-距离曲线将分析获得的荧光亮度转换为距离信息. 如果使用不同的荧光分子与淬灭剂的组合来进行实验, 可根据该荧光分子的光谱、量子效率等参数, 参照参考文献 [21] 中的计算方法计算相应的亮度-距离曲线以用于荧光亮度与距离数据的转换.

### 2.3 $\alpha$ -syn 解离过程的研究

为了研究  $\alpha$ -syn 解离速率与溶液中蛋白浓度的关系, 首先将脂质体连接在盖玻片表面上, 接着加入 0.1 nM  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555, 待视野中的荧光点密度足够多 (200—500 个为宜), 则关闭激光, 并加入一定浓度的 wt- $\alpha$ -syn 替换原溶液. 电荷耦合器件 CCD 的曝光时间为 50 ms/帧, 总时长为 5 s. 期间打开激光, 以低光强 (强度可将视野中的单个分子的荧光点从背景分辨出来即可) 照射约 1 s 即关闭, 此操作降低了光漂白导致的荧光点数量减少的效应. 每隔一定的时间重复录像-开关激光的步骤, 这样就记录了同一视野中荧光点随时间的变化. 最后, 使用 ImageJ 软件对图像进行分析, 统计每个录像中荧光点的个数, 即得出荧光点个数随着时间的变化趋势.

## 3 结果与讨论

### 3.1 $\alpha$ -syn 中央 NAC 区域膜相互作用在高浓度下的变化

为研究较高浓度下  $\alpha$ -syn 与磷脂膜的相互作用特征, 用 LipoFRET 方法, 对溶液中存在一定浓度的  $\alpha$ -syn 时荧光标记的  $\alpha$ -syn 在磷脂膜上的动态过程进行探究.

首先关注的是  $\alpha$ -syn T72 位点. 该位点位于蛋白第二螺旋中的 NAC 区域. NAC 区域连接了  $\alpha$ -syn 的 N 端与 C 端, 且此区域在体外有聚集的特性, 因而被认为是介导聚集的关键区域 [7]. 亦即是说, 该区域是高浓度下参与  $\alpha$ -syn 多体相互作用的可能区域. 在实验中, 首先将包封 5 mM 台盼蓝的脂质体连接在玻片表面上. 接着, 将 0.1 nM  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 加入样品腔室. 待视野中的荧光

点密度足够后, 进行录像, 以记录样品在浓度较低时与磷脂膜相互作用的特征. 在记录足够数据之后, 再在其中加入 50 nM 的未标记荧光的  $\alpha$ -synuclein (wt- $\alpha$ -syn), 继续进行录像, 以记录单个  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 在蛋白总浓度较高时的行为特征. 实验结果如图 2 所示.

在实验中, 发现在蛋白总浓度较低 (0.1 nM) 时, 亮度曲线仍呈现较为平稳的状态, 其相对亮度的值为  $0.65 \pm 0.07$  (中心值  $\pm$  半峰宽, 下同). 膜的厚度约 4.5 nm [34], 此结果确认了 T72 位点位于脂质体磷脂膜的表面附近. 而当加入 50 nM 的 wt- $\alpha$ -syn 之后, 部分荧光亮度有所增强, 并且亮度曲线出现了明显的上下起伏 (图 2(a) 和图 2(d)). 对亮度曲线中较明显状态的亮度进行了统计, 以确定亮度状态的存在与分布. 结果显示, 在较高浓度的  $\alpha$ -syn 存在时,  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 的亮度呈现两个峰的分佈 (图 2(b)). 亮度较低峰的中心值与低浓度下的  $\alpha$ -syn 亮度基本一致, 为  $F/F_0 = 0.63 \pm 0.06$ ; 而亮度较高峰的为  $F/F_0 = 0.83 \pm 0.09$ , 对照图 1(b) 中的曲线, 其中心值对应于膜外 2.1 nm 的位置. 这显示  $\alpha$ -syn 浓度较高时, 一部分蛋白的 NAC 中央区域脱离膜表面, 进入了溶液中 (图 2(c)), 且可在膜表面和溶液中的状态之间互相转换.

接着, 对  $\alpha$ -syn K10 位点的动态过程进行研究. K10 位点所在的 N 端第一螺旋是  $\alpha$ -syn 与膜相互作用较强的区域. 第一螺旋较第二螺旋多出 3 个净的正电荷, 并含有更高比例的疏水残基侧链. 此前的报道中揭示了单个  $\alpha$ -syn 分子 K10 位点在膜中有较明显的动态过程 [21], 在这里探索较高浓度  $\alpha$ -syn 下, K10 位点与膜的相互作用. 由于该位点在膜中位置较深, 为避免荧光信号过弱, 采用 2.5 mM 台盼蓝包封于脂质体中对其进行研究.

图 3 的实验结果显示, 在蛋白总浓度较高时,  $\alpha$ -syn N 端在膜中的动态过程也会有所变化. 在腔室中的蛋白浓度为 0.1 nM 时, 观察到 3 个主要的状态, 其亮度为  $F/F_0 = 0.47 \pm 0.08$ ,  $0.68 \pm 0.06$ , 以及  $0.83 \pm 0.05$ , 分别对应膜以内 3.6 nm, 1.4 nm, 以及膜表面附近的位置 (图 3(a) 和图 3(b)). 而当在溶液中增加了 50 nM 的 wt- $\alpha$ -syn 之后, N 端的动态过程发生了变化. 从典型的亮度曲线 (图 3(d)) 来看, K10 位点有更大概率跳变到更高亮度的位置. 而从亮度统计来看, 较高浓度的  $\alpha$ -syn 存在时, 仍然有 3 个峰的位置, 前两个峰与低浓度的情况相比, 中

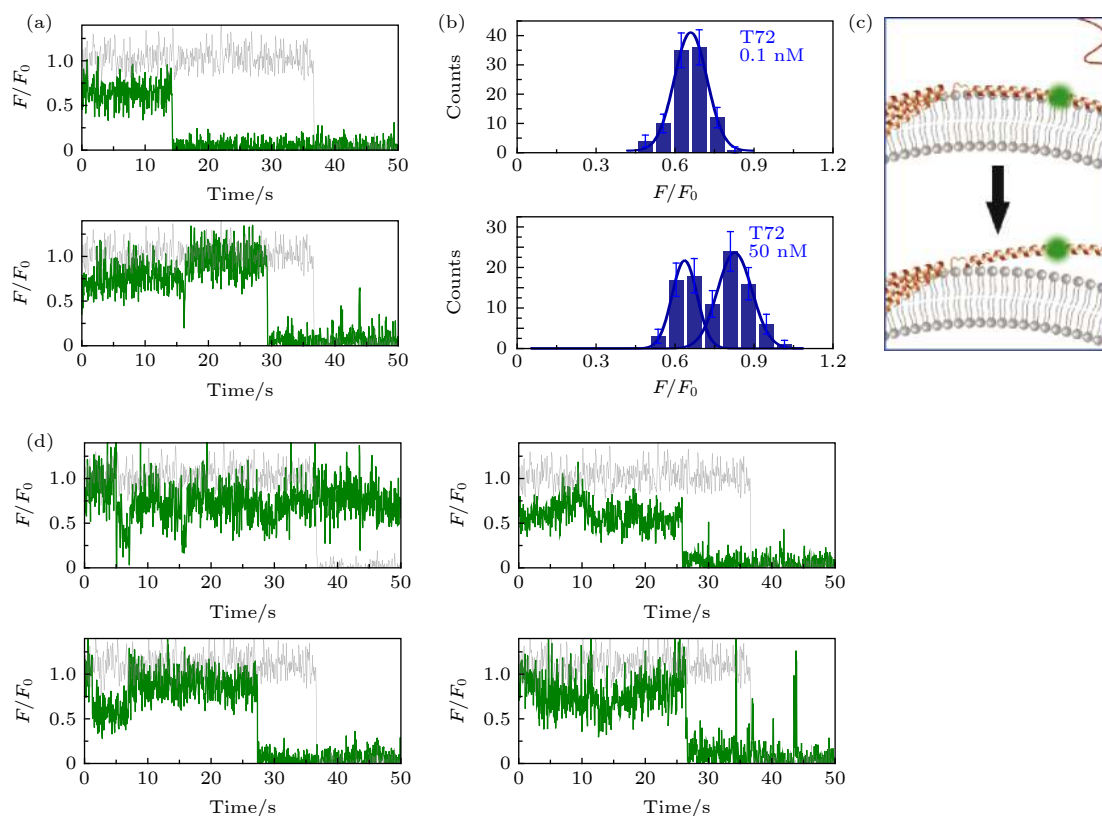


图 2 溶液中存在低蛋白浓度或高蛋白浓度时,  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 在包封 5 mM 台盼蓝的脂质体上的动态特征 (a) 蛋白总浓度为 0.1 nM (上图) 与 50 nM (下图) 时的典型亮度曲线 (其中灰色曲线与绿色曲线分别为包封缓冲液脂质体与包封台盼蓝脂质体上的相对亮度曲线 ( $F/F_0$ )); (b) 蛋白总浓度为 0.1 nM (上图) 与 50 nM (下图) 时的亮度统计 (误差线代表统计偏差); (c) 低浓度 (上部) 与高浓度 (下部) 时, 在磷脂膜上的位置特征示意图; (d) 蛋白总浓度为 50 nM 时更多的典型亮度曲线

Fig. 2. Dynamic of  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 on liposome encapsulating 5 mM trypan blue in the presence of low and high protein concentration in solution: (a) Typical intensity traces of  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 under 0.1 nM (upper panel) or 50 nM wt- $\alpha$ -syn (lower panel) in solution (the grey and green line correspond to the intensity traces on liposomes entrapping buffer ( $F_0$ ) and on liposomes entrapping trypan blue ( $F$ ), respectively); (b) the intensity histograms of the states under 0.1 nM (upper panel) or 50 nM wt- $\alpha$ -syn (lower panel) in solution (the error bars on the histograms represent the statistical error in the bins); (c) the scheme of the position change of  $\alpha$ -syn T72 on the membrane with increased protein concentration in the solution; (d) more intensity traces of  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 in the presence of 50 nM wt- $\alpha$ -syn in solution.

心位置向更亮处移动, 分别为  $F/F_0 = 0.54 \pm 0.07$ ,  $0.71 \pm 0.06$ . 这两个峰对应膜以内 2.9, 1.1 nm 的位置. 亮度最高的峰为  $F/F_0 = 0.86 \pm 0.06$ , 其中心对应膜以外 0.9 nm 的位置. 相比于低浓度下的情况, 除了位置更高之外, 最高亮度的峰所占比例明显升高, 而亮度较低的峰所占比例明显降低. 这提示增加了  $\alpha$ -syn 的溶液中浓度之后, K10 位点所在的第一螺旋更倾向于处在溶液中略高于膜表面的位置 (图 3(c)). 从实验结果来看, 溶液中更高浓度的  $\alpha$ -syn 的加入, 一方面促使 T72 位点脱离膜表面进入溶液中, 另一方面使 K10 位点倾向于从膜内切换至更浅甚至较膜表面更高的位置, 结果表明,  $\alpha$ -syn 溶液中浓度的升高很有可能带来单个蛋白与膜相互作用的减弱.

为了探究高浓度下  $\alpha$ -syn 的存在所导致的

微观层面蛋白与膜相互作用的变化是否会对  $\alpha$ -syn 在膜上的解离性质有所影响, 用不含台盼蓝的脂质体做了  $\alpha$ -syn 在 DOPC/DOPA 膜上的解离测试, 实验结果如图 4 所示. 从图 4 可以看出, 加入 wt- $\alpha$ -syn 后, 随着时间的推移, 原本结合于脂质体上的  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 逐渐减少. 并且, 溶液中  $\alpha$ -syn 的浓度越高, 荧光点减少的速度越快. 此过程表明荧光标记的  $\alpha$ -syn 从脂质体上逐渐解离. 这种现象与一般的结合-解离过程不同. 一般而言, 生物大分子从作用位点上解离由一个解离常数决定, 这个解离常数通常是一个恒定的值, 不随溶液中生物大分子浓度的变化而变化. 而  $\alpha$ -syn 的解离则明显地受浓度调控, 该现象在以往关于  $\alpha$ -syn 的文献中并未报道过. 溶液中的  $\alpha$ -syn 使得已经结合在膜上的蛋白更容易从膜上脱落, 因此,

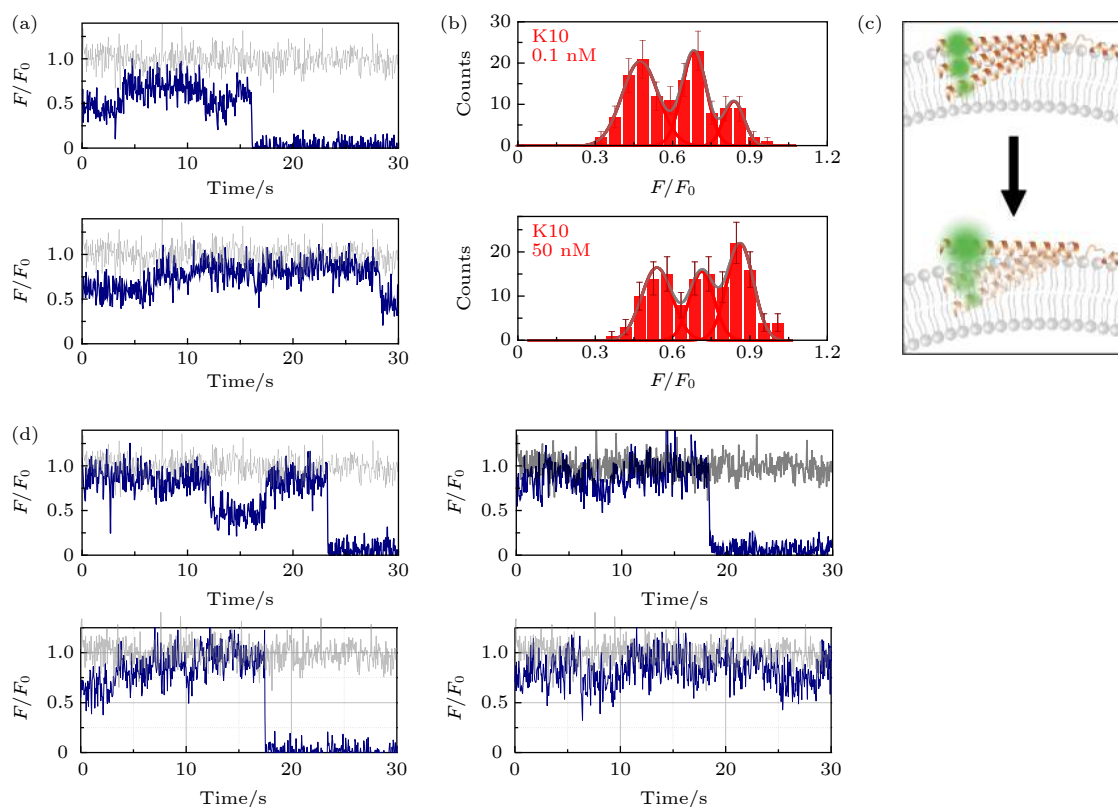


图3 封装 2.5 mM 台盼蓝的脂质体上的  $\alpha$ -syn K10C-Alexa 555 在溶液中存在低浓度与高浓度 wt-50 nM wt- $\alpha$ -syn 时的动态特征 (a) 蛋白总浓度为 0.1 nM (上图) 与 50 nM (下图) 时的典型亮度曲线 (其中灰色曲线与深蓝色曲线分别为封装缓冲液脂质体与封装台盼蓝脂质体上的相对亮度曲线 ( $F/F_0$ )); (b) 蛋白总浓度为 0.1 nM (上图) 与 50 nM (下图) 时的亮度统计 (误差线代表统计偏差); (c) 蛋白低浓度 (上部) 与高浓度 (下部) 时, 在磷脂膜上的位置特征示意图; (d) 蛋白总浓度为 50 nM 时更多的典型亮度曲线

Fig. 3. Dynamic of  $\alpha$ -syn K10C-Alexa 555 on liposome encapsulating 2.5 mM trypan blue in the presence of low and high protein concentration in solution: (a) Typical intensity traces of  $\alpha$ -syn K10 C-Alexa 555 under 0.1 nM (upper panel) or 50 nM wt- $\alpha$ -syn (lower panel) in solution (the grey and dark blue line correspond to the intensity traces on liposomes entrapping buffer ( $F_0$ ) and on liposomes entrapping trypan blue ( $F$ ), respectively); (b) the intensity histograms of the states under 0.1 nM (upper panel) or 50 nM wt- $\alpha$ -syn (lower panel) in solution (the error bars on the histograms represent the statistical error in the bins); (c) the scheme of the position change of  $\alpha$ -syn K10 on the membrane with increased protein concentration in the solution; (d) more intensity traces in the presence of 50 nM wt- $\alpha$ -syn in solution.

LipoFRET 得到的高浓度状态下  $\alpha$ -syn 在膜上垂直位置的变化, 确实导致  $\alpha$ -syn 与磷脂膜相互作用的减弱, 促进了  $\alpha$ -syn 的解离.

根据在实验中从微观与宏观层面得到的结果, 溶液中存在高浓度的  $\alpha$ -syn 时, 应当存在一个包含多个蛋白与磷脂膜形成复合物的过程 (图 5). 对于低浓度下的单个  $\alpha$ -syn 来说, K10 位点有较大概率深入磷脂膜的较深处, 而 T72 位点基本稳定在磷脂膜的表面上. 当溶液中的  $\alpha$ -syn 浓度较高时, 两个  $\alpha$ -syn 有一定的概率充分靠近, 从而发生一个  $\alpha$ -syn K10 位点所在的第一螺旋占据另外一个  $\alpha$ -syn 的 T72 位点所在的第二螺旋与膜作用区域的情况. 此时, 作用位点被占据的  $\alpha$ -syn 第二螺旋与膜的作用减弱, 有一定概率离开磷脂膜的表面. 此

变化导致同一蛋白的第一螺旋切换至膜的浅表位置. 此时,  $\alpha$ -syn 与磷脂膜的相互作用很不稳定, 当第一螺旋与第二螺旋同时处于膜外时, 最终使得其与膜的作用位点容易从膜上脱落下来, 从而导致了宏观上溶液中蛋白浓度升高反而促进蛋白从膜上解离的现象. 需要注意的是, 蛋白之间互相占据膜作用位点的情况是有可能发生的, 因为  $\alpha$ -syn 的第一螺旋带有 3 个正的净电荷, 而 C 端带有 12 个净的负电荷. 其静电作用可能倾向于使  $\alpha$ -syn 的第一螺旋从另外一个  $\alpha$ -syn 的第二螺旋方向靠近并促使替代过程发生. 该过程与 Kamar 等<sup>[35]</sup> 揭示的转录因子从 DNA 上解离的动力学过程具有类似的机理, 因为从微观上看,  $\alpha$ -syn 与磷脂膜之间同样涉及两个  $\alpha$ -螺旋导致的多位点相互作用.



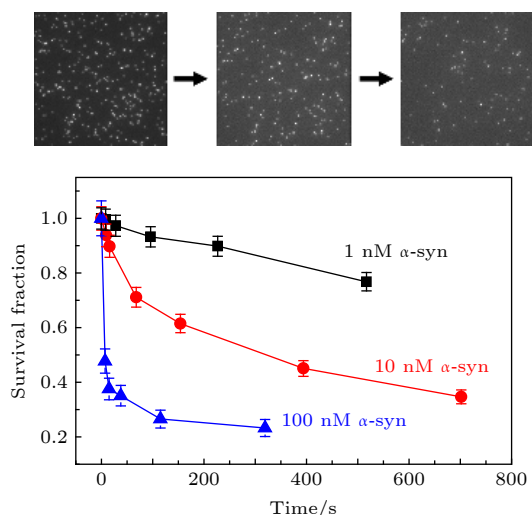


图4 溶液中含有 1 nM, 10 nM, 100 nM 的 wt- $\alpha$ -syn 时, 视野中脂质体上的  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 数量相对于原始数量的比值随时间变化趋势 (误差线代表统计偏差)

Fig. 4. Fraction of the remaining fluorescence spots of  $\alpha$ -syn T72C-Alexa 555 on the liposomes versus time. The solution contains 1 nM, 10 nM, or 100 nM wt- $\alpha$ -syn. The error bars on the histograms represent the statistical error in the bins.

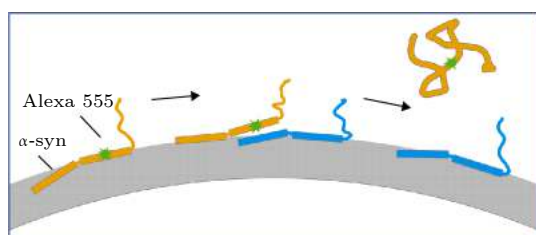


图5 溶液中高浓度的  $\alpha$ -syn 促进标记 Alexa 555 的  $\alpha$ -syn 从膜上解离的过程模型

Fig. 5. Model corresponding to the dissociation of  $\alpha$ -syn from the membrane which was promoted by increased protein concentration.

综上所述, 实验揭示了  $\alpha$ -syn 在高浓度下的行为. 溶液中高浓度的  $\alpha$ -syn 使 T72 位点从膜上解离至溶液中, 而 K10 位点从膜内转移至膜表面甚至溶液中, 从而在宏观上促进了  $\alpha$ -syn 从磷脂膜上的解离. 这与一些研究中的  $\alpha$ -syn 寡聚体在膜上聚集的结果并不一致, 因为如果  $\alpha$ -syn 更易于从膜上解离, 其导致的结果是在膜上的聚集体更难以形成. 但是, 按照 LipoFRET 实验的时间尺度 (仅关注了单分子水平上  $\alpha$ -syn 在与膜相互作用后短时间内的动态变化), 可以认为  $\alpha$ -syn 在磷脂膜存在下的聚集是一个包含解离与成核竞争的复杂动态过程, 这也解释了一些研究中  $\alpha$ -syn 聚集体的生成至少需要数小时的时间尺度的原因 [22]. 高浓度的  $\alpha$ -syn 促进其自身从磷脂膜上解离的性质, 很可能

是  $\alpha$ -syn 在体内调控其聚集过程的重要方式, 因为高浓度下  $\alpha$ -syn 从膜上解离的速率更快则限制了聚集体大小的增长速率. 帕金森病的致病机理有可能和  $\alpha$ -syn 的解离与聚集性质的失调有关. 另外, 此前文献 [36] 报道了  $\alpha$ -syn 与膜作用的不同位点分别连接两个脂质体、介导脂质体之间聚集的模型假设. 此研究中  $\alpha$ -syn 的状态与本文中 LipoFRET 得出的高浓度下  $\alpha$ -syn 在膜上的状态较为吻合. 该现象的发生与一定浓度下  $\alpha$ -syn 发生部分位点从脂质体膜上解离从而与另一个脂质体发生相互作用有关, 即使该相互作用可能是瞬态的. 从另一方面来看, 蛋白浓度是调节  $\alpha$ -syn 与膜的相互作用的重要参数. 在低浓度时, 存在的是较长时间的持续相互作用; 而高浓度时, 则主要为瞬态的相互作用. 在解读和比较研究  $\alpha$ -syn 与膜相互作用的不同研究结果时, 蛋白浓度应作为重要影响因素被纳入考虑.

## 4 结 论

本文使用 LipoFRET 方法研究了在溶液中存在较高浓度的  $\alpha$ -syn 的情况下, 磷脂膜上的单个  $\alpha$ -syn 与膜作用的细节变化. LipoFRET 方法可以在单分子水平上实时动态地监测膜蛋白单个位点处标记的荧光基团在垂直于膜方向上的距离变化, 从而为研究膜蛋白的动力学过程提供重要的实时定量信息.

在实验中发现, 当溶液中  $\alpha$ -syn 的浓度提高时, 磷脂膜上的  $\alpha$ -syn T72 位点所在的 NAC 附近区域可从磷脂膜上解离至溶液中. 而 K10 位点附近区域处在膜中的概率减小, 深度变浅, 并有很大概率脱离膜表面进入溶液中. 这提示在此情况下  $\alpha$ -syn 与磷脂膜的相互作用可能会减弱. 进一步地, 采用单分子荧光成像的方法对  $\alpha$ -syn 与脂质体的解离过程进行了研究. 结果表明,  $\alpha$ -syn 从脂质体上的解离速率确实随着溶液中蛋白浓度的提高而加快, 这与 LipoFRET 的单分子实验的结果是自洽的. 针对这样的现象, 本文提出了  $\alpha$ -syn 蛋白浓度升高导致膜上的  $\alpha$ -syn 与膜的作用位点互相竞争, 进而导致  $\alpha$ -syn 的膜作用位点从膜上解离, 并最终导致  $\alpha$ -syn 与磷脂膜的相互作用减弱从而从膜上解离的模型.  $\alpha$ -syn 浓度调控解离的性质是调节其在膜上寡聚过程的重要一环, 该寡聚过程很可

能涉及聚集与解离的竞争。

此外, 本文的结果也证明了 LipoFRET 方法在探测膜蛋白动力学过程中的适用性。期待将来在膜蛋白功能与结构的研究中, LipoFRET 能得到更广泛的应用。

## 参考文献

- [1] Fusco G, Chen S W, Williamson P T F, Cascella R, Perni M, Jarvis J A, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N, Ying L M, Dobson C M, de Simone A 2017 *Science* **358** 1440
- [2] Sun J C, Wang L N, Bao H, Premi S, Das U, Chapman E R, Roy S 2019 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116** 11113
- [3] de Weerd S 2016 *Nature* **538** S17
- [4] Zou Y, Lü J Q, Zhang Q W, Ni X, Chen P J, Qian Z Y 2019 *Journal of Chongqing Medical University* **44** 473 (in Chinese) [邹昱, 闫坚强, 张庆文, 倪鑫, 陈佩杰, 钱振宇 2019 *重庆医科大学学报* **44** 473]
- [5] Braak H, del Tredici K, Rub U, de Vos R A, Jansen S E N, Braak E 2003 *Neurobiol. Aging* **24** 197
- [6] Burre J 2015 *J. Park. Dis.* **5** 699
- [7] Vekrellis K, Rideout H J, Stefanis L 2004 *Mol. Neurobiol.* **30** 1
- [8] Ulmer T S, Bax A, Cole N B, Nussbaum R L 2005 *J. Biol. Chem.* **280** 9595
- [9] Jao C C, Hegde B G, Chen J, Haworth I S, Langen R 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 19666
- [10] Lowe R, Pountney D L, Jensen P H, Gai W P, Voelcker N H 2004 *Protein Sci.* **13** 3245
- [11] Diao J, Burre J, Vivona S, Cipriano D J, Sharma M, Kyoung M, Sudhof T C, Brunger A T 2013 *eLife* **2** e00592
- [12] Zhang Z W, Zhang J P, Zhou T T, Feng W H, Jiao B H 2010 *Chem. Life* **30** 114 (in Chinese) [张振伟, 张建鹏, 周婷婷, 冯伟华, 焦炳华 2010 *生命的化学* **30** 114]
- [13] Bai J 2016 *Ph. D. Dissertation* (Wuhan: Wuhan Institute of Physics and Mathematics, University of Chinese Academy of Sciences) (in Chinese) [白佳 2016 博士学位论文 (武汉: 中国科学院武汉物理与数学研究所)]
- [14] Dikiy I, Eliezer D 2012 *Biochim. Biophys. Acta* **1818** 1013
- [15] Ferreon A C, Gambin Y, Lemke E A, Deniz A A 2009 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 5645
- [16] van Rooijen B D, Claessens M M, Subramaniam V 2008 *Febs Lett.* **582** 3788
- [17] Jo E, McLaurin J, Yip C M, St George-Hyslop P, Fraser P E 2000 *J. Biol. Chem.* **275** 34328
- [18] Pfefferkorn C M, Heinrich F, Sodt A J, Maltsev A S, Pastor R W, Lee J C 2012 *Biophys. J.* **102** 613
- [19] Jiang Z P, Hess S K, Heinrich F, Lee J C 2015 *J. Phys. Chem. B* **119** 4812
- [20] Hellstrand E, Grey M, Ainalem M L, Ankner J, Forsyth V T, Fragneto G, Haertlein M, Dauvergne M T, Nilsson H, Brundin P, Linse S, Nylander T, Sparr E 2013 *Acs Chem. Neurosci.* **4** 1339
- [21] Ma D F, Xu C H, Hou W Q, Zhao C Y, Ma J B, Huang X Y, Jia Q, Ma L, Diao J J, Liu C, Li M, Lu Y 2019 *Angew. Chem. Int. Ed.* **58** 5577
- [22] Reynolds N P, Soragni A, Rabe M, Verdes D, Liverani E, Handschin S, Riek R, Seeger S 2011 *J. Am. Chem. Soc.* **133** 19366
- [23] Burre J, Sharma M, Sudhof T C 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** E4274
- [24] Wang Z P, Gao G, Duan C L, Yang H 2018 *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* **34** 1013 (in Chinese) [汪志鹏, 高歌, 段春礼, 杨慧 2018 *中国生物化学与分子生物学报* **34** 1013]
- [25] Rabe M, Soragni A, Reynolds N P, Verdes D, Liverani E, Riek R, Seeger S 2013 *Acs Chem. Neurosci.* **4** 408
- [26] Ma L, He X L, Li M, Hu S X 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 148703 (in Chinese) [马丽, 贺小龙, 李明, 胡书新 2018 *物理学报* **67** 148703]
- [27] Chen Z, Ma J B, Huang X Y, Jia Q, Xu C H, Zhang H D, Lu Y 2018 *Acta Phys. Sin.* **67** 118201 (in Chinese) [陈泽, 马建兵, 黄星樾, 贾棋, 徐春华, 张慧东, 陆颖 2018 *物理学报* **67** 118201]
- [28] Gennis R B, Cantor C R 1972 *Biochemistry* **11** 2509
- [29] Lee J, Lee S, Ragunathan K, Joo C, Ha T, Hohng S 2010 *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** 9922
- [30] Ha T, Enderle T, Ogletree D F, Chemla D S, Selvin P R, Weiss S 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 6264
- [31] Joo C, McKinney S A, Nakamura M, Rasnik I, Myong S, Ha T 2006 *Cell* **126** 515
- [32] Diez M, Zimmermann B, Borsch M, König M, Schweinberger E, Steigmiller S, Reuter R, Felekyan S, Kudryavtsev V, Seidel C A, Gruber P 2004 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11** 135
- [33] Kerssemakers J W, Munteanu E L, Laan L, Noetzel T L, Janson M E, Dogterom M 2006 *Nature* **442** 709
- [34] Nagle J F, Tristram-Nagle S 2000 *Biochim. Biophys. Acta* **1469** 159
- [35] Kamar R I, Banigan E J, Erbas A, Giuntoli R D, de la Cruz M O, Johnson R C, Marko J F 2017 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114** E3251
- [36] Fusco G, Pape T, Stephens A D, Mahou P, Costa A R, Kaminski C F, Schierle G S K, Vendruscolo M, Veglia G, Dobson C M, de Simone A 2016 *Nat. Commun.* **7** 12563



# Investigation of structure and dynamics of $\alpha$ -synuclein on membrane by quenchers-in-a-liposome fluorescence resonance energy transfer method\*

Ma Dong-Fei<sup>1)3)</sup> Hou Wen-Qing<sup>1)3)</sup> Xu Chun-Hua<sup>1)</sup> Zhao Chun-Yu<sup>2)3)</sup>  
 Ma Jian-Bing<sup>1)</sup> Huang Xing-Yuan<sup>1)3)</sup> Jia Qi<sup>1)3)</sup> Ma Lu<sup>1)</sup>  
 Liu Cong<sup>2)3)</sup> Li Ming<sup>1)3)</sup> Lu Ying<sup>1)3)†</sup>

1) (*Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics and CAS Key Laboratory of Soft Matter Physics,*

*Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)*

2) (*Interdisciplinary Research Center on Biology and Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry,*

*Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)*

3) (*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)*

( Received 21 October 2019; revised manuscript received 10 November 2019 )

## Abstract

$\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) is a key protein involved in Parkinson's disease. There have been many researches about  $\alpha$ -syn in recent years. It was suggested that the aggregation of  $\alpha$ -syn may induce the lipid membranes to disrupted, which is related to the pathology of neurodegenerative diseases. Thus the studying of the dynamics of  $\alpha$ -syn on membranes, especially in the presence of high-concentration protein, is important for understanding its function and its role in the pathology. In this study, we use LipoFRET, a single molecule method based on the principle of energy transfer between the donor labeled on the biomolecule and the quenchers encapsulated in the liposome. The quenchers encapsulated in liposomes attenuate the fluorescence attached to membrane proteins near the membrane, or penetrating in the membranes. If interesting site of membrane protein can be labeled, the LipoFRET could probe positional changes of a single membrane protein in the direction normal to the membrane. In the research of  $\alpha$ -syn by LipoFRET, some interesting results can be obtained with different concentrations of protein. On the one hand, with the increase of concentration of  $\alpha$ -syn in solution, the centre domain of  $\alpha$ -syn can leave the surface of the lipid bilayer and enter into the aqueous solution. However, this domain of  $\alpha$ -syn is located around the membrane surface at low concentration. On the other hand, the N-terminus of  $\alpha$ -syn with three main positions at low concentration of protein, maintains three but different positions in the membrane at high concentration, where each position is closer to or above the outer surface of liposome. The above phenomena suggest that the interaction between  $\alpha$ -syn and membranes might be weakened with the increase of concentration of protein. At the same time, with single molecule fluorescence imaging, we also observe the promoted dissociation rates for individual fluorophore labeled  $\alpha$ -syn from liposomes with high concentration of unlabeled proteins in solution. The result is consistent with the result of our single-molecule experiment with LipoFRET. Along with the results from LipoFRET, it could be indicated that there is a competition process where each  $\alpha$ -syn could be occupied by the other one at high protein concentration, which leads to the dissociation. The concentration-dependent dissociation may be the property that regulates the aggregation of  $\alpha$ -syn in vivo, which is one of the important factors that influence the pathology of the neurodegenerative diseases.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein, fluorescence resonance energy transfer, dissociation, membrane-protein interaction

**PACS:** 87.14.ep, 87.15.H-, 87.15.hg, 87.15.kt

**DOI:** 10.7498/aps.69.20191607

\* Project supported by the National Science Foundation of China (Grant Nos. 11674382, 11834018, 91753104, 11574381), the CAS Key Research Program of Frontier Sciences (Grant No. QYZDJ-SSW-SYS014), and the Youth Innovation Promotion Association of CAS, China (Grand No. 2017015).

† Corresponding author. E-mail: [yinglu@iphy.ac.cn](mailto:yinglu@iphy.ac.cn)