

重组 APP-N 端蛋白与神经节苷脂 GM1 相互作用后的构象变化*

丁吉新¹⁾ 沙印林²⁾ 阮燕¹⁾ 朱忠军¹⁾ 黄力新²⁾ 耿慧敏²⁾ 聂松青²⁾ 张岱^{1)**}

(¹⁾北京大学精神卫生研究所, 北京 100083; ²⁾北京大学医学部生物物理系, 北京 100083)

摘要 用基因重组方法制备人类 β -淀粉样蛋白前体 (APP) N 端融合蛋白 APP_{28~123}, 应用荧光光谱和圆二色谱技术观测 GM1 对 APP_{28~123} 构象的影响. 结果表明: APP_{28~123} 与 GM1 水溶液和含 GM1 的脂质体孵育后, 其荧光强度明显增强, 最大发射峰位蓝移 20 nm; APP_{28~123} 在溶液中的二级结构以 α 螺旋为主, 峰位在 208 nm 和 222 nm, 而 APP_{28~123} 与 PC/GM1 脂质体或 GM1 水溶液孵育后, 其二级结构虽以 α 螺旋为主, 但摩尔椭圆度 (θ) 值明显增强. 以上结果表明 GM1 改变了 APP_{28~123} 二级结构, 提示 GM1 引起 APP 分子构象的改变, 可能影响 APP 分子正常生理功能和跨膜转运过程.

关键词 阿尔茨海默病, β -淀粉样蛋白前体, 神经节苷脂 GM1, 荧光光谱, 圆二色谱

学科分类号 Q71, R749

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发病于老年期前后, 以进行性痴呆为主要临床特征的大脑退行性疾病. 既往研究证明 β -淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 构成 AD 脑特征性病变老年斑的核心成分, 与 AD 的发生发展密切相关^[1~3]. 现有研究提示, β -淀粉样蛋白前体 (amyloid β protein precursor, APP) 的异常加工过程能促使 A β 生成增加, 故而探讨 APP 加工的有关影响因素有助于阐明 A β 的生成机制.

神经节苷脂 GM1 是细胞膜重要组分, 在中枢神经系统的含量最为丰富. 已有资料证明 GM1 促进 APP695cDNA 基因转染 SY5Y 细胞 A β 分泌, 可能与 γ 分泌酶活性增高有关^[4,5]. 另有研究表明, APP 分子 N 端存在一个 GM1 的活性区^[4,6]. 据此推测, GM1 通过与 APP 分子的结合, 可能改变了 APP 的立体构象, 有利于 γ 分泌酶的剪切, 导致细胞 A β 释放的增加. 为了研究 GM1 对 APP 分子构象的可能影响, 本研究通过制备 APP 基因第 2、3 外显子编码 N 端融合蛋白 (APP_{28~123})^[7], 研究 APP_{28~123} 与 GM1 相互作用后的构象变化, 旨在探讨脂膜成分 GM1 对 APP 代谢过程的影响, 有助于明确 GM1 促进细胞 A β 分泌的机制.

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)、GM1 购自 Sigma 公司. pQE30 原核表达载体, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自 Qiagen 公司. 多克隆抗 APP-N

端片段抗体 22734, 德国海德堡大学分子生物学中心馈赠. F4500 荧光分光光度仪为日本日立公司产品, 圆二色谱仪为日本 Jasco 公司产品.

1.2 APP_{28~123} 蛋白的制备及纯化

1.2.1 目的基因片段扩增克隆及序列鉴定: APP N 端上游引物为 GCGGATCCCTGCTGGCTGAA-CCCCAGATT, 含 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物为 CCGAAGCTTCAATCACTTACAAACTCACC AACT, 含 *Hind* III 酶切位点和终止密码子 CAA. 将酶切后的 PCR 产物和双酶切后的 pQE30 质粒在 T4 连接酶作用下连接, 构建重组融合表达质粒 pQE30-APP_{28~123}. 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切和 DNA 序列测定方法对重组质粒进行鉴定.

1.2.2 APP N 端融合蛋白的表达及纯化:

a. 重组 APP 融合蛋白的表达: 将测序正确的重组质粒 pQE30-APP_{28~123} 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 氨苄青霉素 (Amp) 抗性筛选转化重组子. 将含表达质粒的单克隆菌落在 2 × YT 培养基中培养, 加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 收集菌体. 冰浴中超声裂解菌体, 释放出包涵体 (IB), 离心分别收集上清液和沉淀 (包涵体).

b. 肝素亲和层析纯化 APP 融合蛋白: 因 APP_{28~123} 含有一个肝素亲和位点, 故可用肝素亲

* 国家自然科学基金资助项目 (39870276, 39840010) 和国家重点基础研究发展规划项目 (G1999064007).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62078246, E-mail: daizhang@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2002-07-02, 接受日期: 2002-09-12

和层析方法纯化. 肝素-sepharose CL-4B 亲和层析介质 (购自 Pharmacia 公司), 先用超纯水溶胀, 装柱后用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液充分平衡, 将所得上清液直接上柱吸附. 吸附完毕后先用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤非特异吸附的杂蛋白, 然后用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液含梯度 NaCl 的溶液洗脱 APP_{28~123}, 分步收集洗脱液, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法鉴定, 寻找最佳洗脱纯化的条件. 包涵体按文献 [8] 介绍方法处理, 紫外分光光度计法对复性后的蛋白质进行定量. 最后, 20 000 r/min 高速离心 20 min, 取上清液按上述亲和层析方法进行纯化.

1.3 APP_{28~123}蛋白与 GM1 结合实验

取 100 ng 纯化后 APP_{28~123} 与 500 ng GM1 在室温下孵育 6 h, 加入 Laemmli 加样缓冲液终止结合反应, 70 °C 加热 10 min 后上样, 电泳用 10% Tris-Tricine 凝胶. 电泳结束后, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜 (400 mA, 80 min), 该膜用 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 加入 22734 (1:5000 稀释) 室温孵育 1 h, 再用碱性磷酸酶偶联羊抗兔-IgG 孵育 1 h, PBS (pH 7.4) 洗三次, 碱性磷酸酶缓冲液加入氮蓝四唑 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 (BCIP) 显色.

1.4 APP_{28~123}蛋白与 GM1 的相互作用

1.4.1 PC 和 PC/GM1 脂质体的制备: 取适量的磷脂和 GM1 溶于 CHCl₃/CH₃OH (2:1, 体积比) 溶剂中, 按实验设计要求制备小单层脂质体 (small unilamellar vesicles, SUVs). 脂溶于 CHCl₃/CH₃OH (2:1, 体积比) 溶剂后, 氮气吹干, 低温真空干燥 3 h, 用 PBS 缓冲液水化, 用旋涡振荡器振荡 10 min, 25 °C 水浴超声至溶液澄清, 得到小单层脂质体.

1.4.2 荧光光谱的测量: 用 F4500 荧光分光光度计测量 APP_{28~123} 蛋白的内源性荧光曲线, 测量温度 25 °C, 激发波长 275 nm, 发射波长扫描范围为 300~450 nm. 激发和发射的狭缝宽度均为 5 nm, 蛋白质浓度为 20 mg/L. 荧光强度扣除了背景吸收, 蛋白质溶液的荧光强度为 F_0 , 加入 GM1 或脂质体后的荧光强度为 F , 相对荧光强度的百分数为 $R = (F - F_0) / F_0 \times 100\%$, 观察加入 GM1 或脂质体后蛋白质荧光强度和荧光峰位的变化.

1.4.3 圆二色谱的测量: 取 150 μ g APP_{28~123} 蛋白分别溶于 100 μ l 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

缓冲液, GM1 溶液, PC、PC/GM1 (1:1, 质量比) 和 PC/GM1 (1:2, 质量比) 的小单层脂质体溶液中, APP_{28~123} 与 GM1 的摩尔比为 1:15. 25 °C 孵育 30 min 后, 取 100 μ l 样品溶液放入 0.02 cm 测量杯中进行测定. 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、GM1 溶液或 PC 或 PC/GM1 脂质体作为溶剂对照, 同一样品重复测量 3 次. CD 仪 Jasco JS810 型, 0.02 cm 石英比色皿, 扫描范围 190~250 nm, 灵敏度为 50 mdeg, 分辨率 0.5 nm, 狭缝宽度为 2.0 nm, 反应时间 1 s, 扫描速度为 100 nm/min, 累加次数 4 次, 测量温度 25 °C.

2 结 果

2.1 APP_{28~123}蛋白的制备及纯化

2.1.1 融合基因的序列分析: 以含完整人类 APP695cDNA 的 pBluscript II 695 质粒为模板, 用高保真 pfu 酶 PCR 方法获取编码 APP N 端第 28~123 氨基酸片段的基因, 构建了 pQE-APP_{28~123} 表达载体. 测序结果发现融合基因的序列分析与预期的序列完全相同.

2.1.2 融合蛋白的表达和纯化: 将含表达质粒 pQE-APP_{28~123} 的单克隆菌落在 2 × YT 培养基培养, 经 IPTG 诱导表达后, 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析. 结果发现 APP_{28~123} 融合蛋白的分子质量为 12.5 ku, 将大量表达的融合蛋白超声裂解, 分别收集上清和包涵体, 上肝素亲和层析柱, 用梯度 NaCl 溶液对 APP_{28~123} 片段进行洗脱, 结果发现在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 mol/L NaCl 时可将 APP_{28~123} 与杂蛋白有效地分离, 从而利用肝素亲和层析方法纯化得到了 APP_{28~123} 蛋白. 洗脱后分别测定洗脱液中蛋白质含量. 结果上清和包涵体中均含有目的蛋白, 纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 分析, 纯度在 90% 以上.

2.1.3 融合蛋白的蛋白质印迹分析: 将 GM1 与 APP_{28~123} 融合蛋白共孵育, 蛋白质印迹结果显示, 同时存在 GM1 和 APP_{28~123} 融合蛋白的样品孵育后, 经 APP N 端特异性抗体 22734 识别, AP 系统显色后, 在 APP_{28~123} 融合蛋白正常泳动条带位置上方, 出现一条与 GM1-APP_{28~123} 融合蛋白复合物分子质量相吻合的条带, 且这个条带可为 22734 抗体识别. 而无 GM1 共孵育的融合蛋白则无此条带 (图 1).

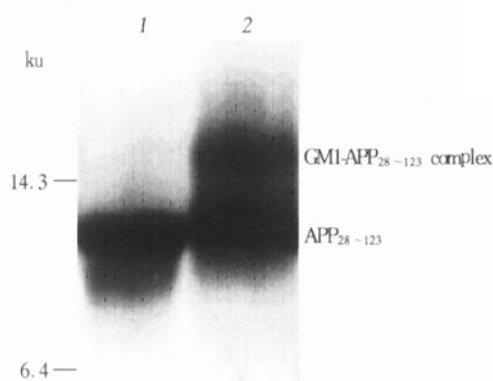


Fig. 1 Detection of binding between GM1 and APP₂₈₋₁₂₃ by Western blotting

1: APP₂₈₋₁₂₃; 2: APP₂₈₋₁₂₃-GM1 mixture.

2.2 蛋白质 APP₂₈₋₁₂₃ 的荧光光谱

2.2.1 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白与 GM1 水溶液共孵育后的荧光光谱: GM1 溶液与 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白在室温共孵育 30 min 后, 测其荧光曲线. 结果观察到

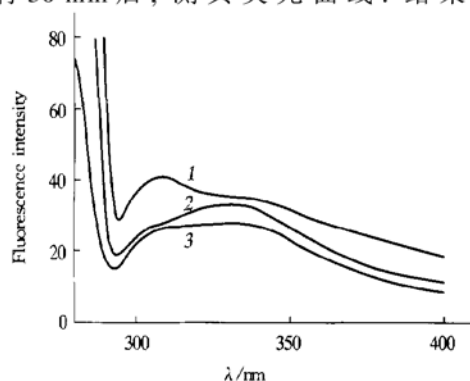


Fig. 2 The fluorescence intensity of interaction of APP₂₈₋₁₂₃ and GM1 solution

1: APP₂₈₋₁₂₃ in GM1 solution; 2: APP₂₈₋₁₂₃ alone; 3: APP₂₈₋₁₂₃ in PBS buffer.

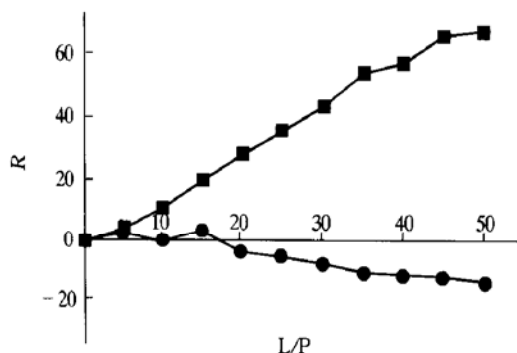


Fig. 3 The titration curve of APP₂₈₋₁₂₃ with GM1 solution

Relative fluorescence, $R = (F - F_0) / F_0$, is plotted as a function of L/P. Fluorescence intensity at 350 nm in the presence and absence of GM1 are denoted by F and F_0 , respectively, L/P is the mole ratio of GM1 and protein. ●—●: PBS; ■—■: GM1.

APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白荧光强度随 GM1 浓度的增加显著增加, 但当脂质体与多肽比例 (L/P) 达到 50 时基本达到饱和, 并且发射波长蓝移 20 nm, 从原来的最大发射峰位 330 nm 蓝移至 310 nm, 而单加入 PBS 对 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白的荧光强度及峰位均未见明显影响 (图 2, 图 3).

2.2.2 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白与 GM1 脂质体孵育后的荧光光谱: GM1 脂质体与 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白在室温共孵育 30 min 后, 测其荧光曲线. 结果观察到 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白荧光强度随含 GM1 脂质体浓度的增加显著增加, 并且最大发射峰位蓝移 20 nm, 从原来的最大发射峰位 330 nm 蓝移至 310 nm, 而单加 PC 脂质体和 PBS 溶液对 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白荧光强度和峰位无明显影响 (图 4, 图 5).

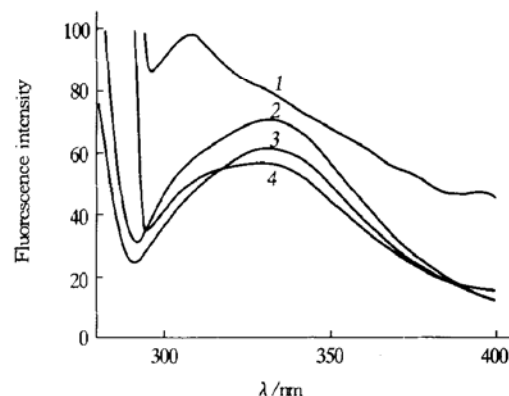


Fig. 4 The fluorescence intensity of interaction of APP₂₈₋₁₂₃ and PC/GM1 vesicles

1: APP₂₈₋₁₂₃ in PC/GM1 vesicles; 2: APP₂₈₋₁₂₃ alone; 3: APP₂₈₋₁₂₃ in PC vesicles; 4: APP₂₈₋₁₂₃ in PBS buffer.

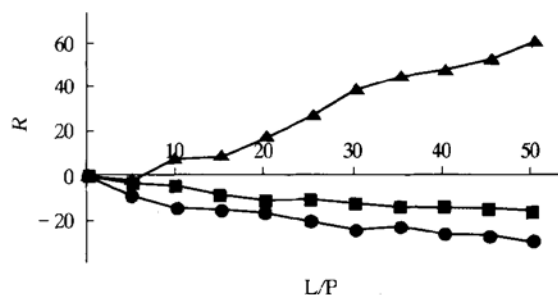


Fig. 5 The titration curve of APP₂₈₋₁₂₃ with SUVs of various lipid compositions

●—●: PBS; ▲—▲: GM1; ■—■: PC.

2.3 APP₂₈₋₁₂₃ 蛋白的圆二色谱

蛋白质 APP₂₈₋₁₂₃ 自身的 CD 谱, 以 α 螺旋为主, 峰位在 208 nm 和 222 nm, 与 PC 脂质体作用后, 仍以 α 螺旋为主, 峰位在 208 nm 和 222 nm, θ 值基本未发生明显变化. 与 GM1 溶液或含 GM1

的脂质体作用后, 峰位未发生明显变化, 但 θ 值强度明显增加. 说明 GM1 与 APP_{28~123} 相互作用后改变了后者的构象, 使其二级结构中 α 螺旋成分增加 (图 6, 图 7).

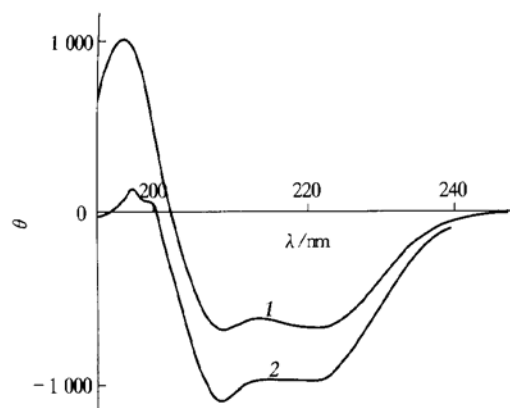


Fig. 6 The CD spectrum of APP_{28~123} in GM1 solution

1: the CD spectrum of APP_{28~123} in Tris buffer; 2: the CD spectrum of APP_{28~123} in GM1 solution.

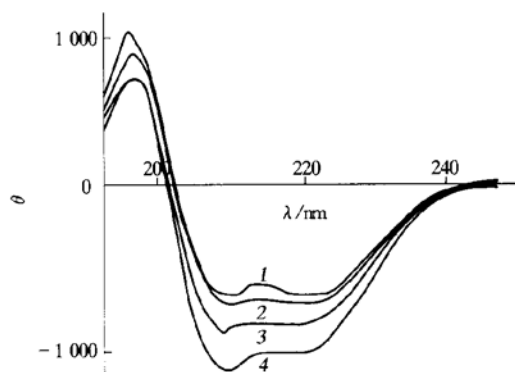


Fig. 7 The CD spectrum of APP_{28~123} in different conditions

1: the CD spectrum of APP_{28~123} in Tris buffer; 2: the CD spectrum of APP_{28~123} in PC vesicle; 3: the CD spectrum of APP_{28~123} in PC/GM1 (w/w , 1:1); 4: the CD spectrum of APP_{28~123} in PC/GM1 (w/w , 1:2).

3 讨 论

荧光测定实验结果表明 APP_{28~123} 与 GM1 水溶液和含 GM1 的脂质体孵育后, 其荧光强度明显增强, 最大发射峰位蓝移 20 nm, 说明这段蛋白质插入脂质体, 其发光的氨基酸进入脂质体的疏水区. 提示 APP_{28~123} 色氨酸残基的环境从极性的水相变为非极性的疏水相, 这是由于 APP_{28~123} 和脂作用后其部分氨基酸残基插膜进入脂双层的结果^[9].

CD 实验结果表明 APP_{28~123} 在溶液中的二级结构以 α 螺旋为主, 峰位在 208 nm 和 222 nm. 当 APP_{28~123} 与 PC/GM1 脂质体和 GM1 溶液孵育

30 min 后, 虽然 APP_{28~123} 的峰位无明显变化^[10], 但 θ 值明显增加, 且随 GM1 浓度增长而增加. 说明 GM1 与 APP_{28~123} 相互作用后, 使 APP_{28~123} 的 α 螺旋成分增加, 而这种结构比较容易进行插膜, 发光的氨基酸容易进到脂质体的疏水区, 结果导致 APP_{28~123} 蛋白内源性荧光强度增强和 θ 值增加.

据文献报道, APP_{28~123} 区域 (APP 基因第 2、3 外显子) 含有肝素结合位点^[11,12], 并具有神经营养作用^[13,14], 其 X 射线衍射晶体结构显示该区域具有配体结合特征^[7]. 但 APP_{28~123} 区域是否具有其他功能尚不清楚. 本实验室既往工作证明, APP 分子 N 端第 18~81 氨基酸残基区间存在一个 GM1 的结合位点^[4,6], 结合本实验结果分析, GM1 不但与 APP_{28~123} 结合, 而且还改变后者的构象. 这种变化一方面可能影响了 APP 分子的正常生理功能, 另一方面 GM1 与 APP 相互作用可能干扰了 APP 分子的运输和内存, 使其在膜上的滞留时间延长, 为 γ 分泌酶提供更多的底物, 引起细胞 A β 生成增加. 以上结果也解释了外源性 GM1 可干扰人 APP695 cDNA 转染细胞 APP 的代谢过程, 细胞培养液中分泌型 APP 的水平随着 GM1 剂量的增加而下降, 而细胞溶解物中 APP 含量则随着 GM1 浓度的增加而增长这一现象^[4,5]. 当然, 为了更精确地了解 GM1 对 APP 分子加工过程的影响, 需要应用活细胞单分子研究等新技术对其作用机制进行深入研究.

已有研究提示 GM1 参与细胞代谢、信号传递, 是某些毒素蛋白特异性受体^[15,16], 发现 AD 脑 GM1 含量增加^[17], 近期研究发现老年斑有 GM1 成分^[18,19], 提示 GM1 可能参与 AD 的病理变化. 总结文献资料和本实验结果, GM1 影响 APP 的加工代谢过程, 可能不仅与 APP 分子在细胞膜上的锚定内化等过程相关, 而且也可能在 APP 胞内代谢的多个层面上影响 APP 的加工代谢过程, 这对于深入研究 GM1 代谢异常与 AD 发病的关系等有重要价值.

参 考 文 献

- 1 Kang J, Lemaire H G, Unterbeck A, *et al.* The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature*, 1987, **325** (6106): 733~736
- 2 Citron M, Diehl S T, Gordon G, *et al.* Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid protein are generated from the amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (23): 13170~13175
- 3 Selkoe D J. Cell biology of the amyloid protein precursor and the

- mechanism of Alzheimer possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Ann Cell Biol*, 1994, **10**: 373~ 403
- 4 张岱, 阮燕, Beyreuther K, 等. 神经节苷酯 GM1 对阿尔采默病 β -淀粉样蛋白前体代谢的影响. *中华医学杂志*, 1998, **78** (3): 179~ 182
Zhang D, Ruan Y, Beyreuther K, *et al.* *Natl Med J China*, 1998, **78** (3): 179~ 182
 - 5 张岱, Hartman T, Beyreuther K. 神经节苷酯 GM1 促进 Alzheimer 病长 β -淀粉样蛋白分泌以及干扰 β -淀粉样蛋白前体代谢. *中国心理卫生杂志*, 1998, **12** (2): 97~ 100
Zhang D, Hartman T, Beyreuther K. *J Mental Heal China*, 1998, **12** (2): 97~ 100
 - 6 丁吉新, 阮燕, 朱忠军, 等. β -淀粉样蛋白前体 N 端神经节苷酯 GM1 结合位点定位分析. *北京大学学报 (医学版)*, 2002, **34** (5): 594~ 598
Ding J X, Ruan Y, Zhu Z J, *et al.* *J Peking Uni (Heal Sci)*, 2002, **34** (5): 594~ 598
 - 7 Rossjohn J, Cappai R, Feil S C, *et al.* Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature Structure Biol*, 1999, **6** (4): 327~ 331
 - 8 储淳, 周健, 何黔川, 等. 重组人白细胞介素-6 的纯化. *微生物学免疫学进展*, 1999, **27** (1): 47~ 51
Zhu C, Zhou J, He Q C, *et al.* *Prog Micro Immnu*, 1999, **27** (1): 47~ 51
 - 9 Surewicz W K, Epand R M. Role of peptide structure in lipid-peptide interactions: a fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 1984, **23** (25): 6072~ 6077
 - 10 Sreerama N, Venyaminov S Y, Woody R W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. *Anal Biochem*, 2001, **299** (2): 271~ 274
 - 11 Clarris H J, Cappai R, Heffernan D, *et al.* Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem*, 1997, **8** (3): 1164~ 1172
 - 12 Mok S S, Sberna G, Heffernan D, *et al.* Expression and analysis of heparin-binding regions of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *FEBS Lett*, 1997, **415** (3): 303~ 307
 - 13 Clarris H J, Nurcombe V, Small D H, *et al.* Secretion of nerve growth factor from septum stimulates neurite outgrowth and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from hippocampal explants. *J Neurosci Res*, 1994, **38** (3): 248~ 258
 - 14 Small D H, Nurcombe V, Reed G, *et al.* A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*, 1994, **14** (4): 2117~ 2127
 - 15 Rogers T B, Snyder S H. High affinity binding of tetanus toxin to mammalian membrane. *J Biol Chem*, 1981, **256** (5): 2402~ 2407
 - 16 Terzaghi A, Tettamanti G, Masserini M. Interaction of glycosphingolipids and glycoproteins: thermotropic properties of model membranes containing GM1 ganglioside and glycophorin. *Biochemistry*, 1993, **32** (37): 9722~ 9725
 - 17 Peter B, Crino M, David U. Brain gangliosides in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol*, 1989, **5** (46): 389~ 401
 - 18 Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, *et al.* GM1 ganglioside-bound amyloid beta protein (A β): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 1995, **1** (10): 1062~ 1066
 - 19 McLaurin J, Franklin T, Fraser P E, *et al.* Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer beta amyloid peptides with gangliosides. *J Biol Chem*, 1998, **273** (8): 4506~ 4515

The Effects of GM1 on Conformational Changes of The N-terminus of APP*

DING Ji-Xin¹⁾, SHA Yi-Lin²⁾, RUAN Yan¹⁾, ZHU Zhong-Jun¹⁾,
HUANG Li-Xin²⁾, GENG Hui-Min²⁾, NIE Song-Qing²⁾, ZHANG Dai^{1)**}

(¹⁾ The Institute of Mental Health, Beijing 100083, China;

(²⁾ Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is neuropathologically characterized by the presence of extracellular amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles. The core of senile plaque is amyloid β -protein (A β), which comes from its precursor — amyloid β -protein precursor (APP). The pQE-APP_{28~123} plasmids was constructed by gene recombination. The APP_{28~123} protein was expressed in *Escherichia coli* and then purified. The purified products were examined for GM1 binding abilities by Western blotting. The effects of GM1 on conformation of APP N-terminus were detected by fluorescence and circular dichroism (CD) techniques. APP_{28~123} protein could bind with GM1. The intrinsic fluorescence intensity of APP_{28~123} protein in PC/GM1 vesicles or GM1 solution remarkably increased and the fluorescence peak value blue shifted 20 nm. CD results showed that the major secondary structure of APP_{28~123} in PBS buffer was α -helix. When APP_{28~123} incubated with PC/GM1 vesicles or GM1 solution, the α -helix content increased markedly. These results suggested that GM1 might affect the physiological function of APP and change APP span-membrane process and interfere APP trafficking and internalization by anchoring this molecule on the membrane, which may provide much more substrate for γ -secretase and enhance A β generation on the cells.

Key words Alzheimer's disease, amyloid β -protein precursor, ganglioside GM1, fluorescence, circular dichroism

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39870276, 39840010), The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999064007).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62078246, E-mail: daizhang@bjmu.edu.cn

Received: July 2, 2002 Accepted: September 12, 2002