

非酶糖基化对 α -synuclein 分子构象的影响*

盛之玲^{1,2,3)} 刘延英¹⁾ 陈 岚¹⁾ 赫荣乔^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049; ³⁾郑州大学医学院, 郑州 450052)

摘要 将纯化后的 α -synuclein 分别与果糖和葡萄糖孵育, 通过内源荧光、非酶糖基化衍生物特征荧光、圆二色光谱以及电子显微镜等技术进行检测发现: α -synuclein 与还原糖共同孵育后, 308 nm 内源荧光强度明显降低, 同时在 447 nm 产生一个非酶糖基化衍生物特征荧光. 与果糖孵育的蛋白质样品其非酶糖基化特征荧光的出现速度快于葡萄糖孵育样品. 内源荧光与非酶糖基化特征荧光之间存在能量传递现象, 提示 Tyr 残基与非酶糖基化特征荧光发色团在空间距离上彼此接近. 圆二色光谱测定结果显示, α -synuclein 与果糖孵育后, 其 α -螺旋含量增加. 非酶糖基化的 α -synuclein 在电子显微镜下表现为短纤维状. 非酶糖基化可以诱导 α -synuclein 蛋白分子聚集, 且果糖较葡萄糖更容易使 α -synuclein 发生非酶糖基化. 以上结果提示, 非酶糖基化似乎可以导致 α -synuclein 在细胞内的错误折叠和分子聚集.

关键词 非酶糖基化, α -synuclein, 分子构象, 特征荧光, 错误折叠, 分子聚集, 神经退行性疾病

学科分类号 Q5, Q6, Q7

α -synuclein 是帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 病人脑中路易氏小体 (Lewy bodies, LB) 的主要成分^[1,2], 其聚集体也在其他神经退行性疾病, 如 LB 痴呆、多发性萎缩、老年性痴呆等病人脑内发现^[3,4]. α -synuclein 在不同脑区表达, 富集在突触前末梢^[5]. 常染色体显性家族性帕金森病被证实与 α -synuclein 分子的点突变 (A53T、A30P) 相关^[6,7]. 在 LB 小体中, α -synuclein 错误折叠并聚集形成淀粉样纤维. 目前研究表明, 蛋白质翻译后的异常修饰往往是蛋白质错误折叠的重要诱导因素. 因此, 研究糖基化及其所导致的蛋白质构象的变化对于阐释 α -synuclein 的错误折叠、分子聚集具有重要的参考价值.

α -synuclein 是一种天然的非折叠态蛋白^[8~10]. 体外实验表明, 该蛋白质在一定条件下可以自发聚集形成纤维状结构^[11]. 但是, 异常修饰如磷酸化等可以促进 α -synuclein 错误折叠和分子聚集^[12]. 值得注意的是, 非酶糖基化(下文中“糖基化”一词皆指“非酶糖基化”)常常是糖的羰基与蛋白质分子上的氨基作用而形成, 也是影响蛋白质结构与功能的一种重要化学修饰, 并且蛋白质糖基化普遍发生在细胞内外. 尸检结果表明, 蛋白质的非酶糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs)

与 α -synuclein 在散发性路易氏体患者脑内具有共定位现象^[13]. 然而, α -synuclein 的非酶糖基化对其分子构象的影响目前尚未见报道. 在此, 本文作者报道果糖与葡萄糖对 α -synuclein 的非酶糖基化所导致的构象变化.

1 材料和方法

1.1 材料

含人源 α -synuclein 基因质粒 pET-3a-AS 由中国科学院生物物理研究所王志珍教授馈赠 (来源于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所, 胡红雨教授). BCA (The bicinchoninic acid) 蛋白定量试剂盒为 Pierce Biotechnology 公司产品. F-4500 荧光分光光度计 (Hitachi 公司) 用作荧光扫描; 用 Jasco J-720 圆二色谱仪测定远紫外圆二色谱 (Circular Dichroism, CD) 观察蛋白质二级结构变化; JEM-100CX 电子显微镜用于观察糖基化蛋白

* 国家自然科学基金 (90206041, 30570536), 国家重点基础研究发展计划 (973) (2006CB500703), 中国科学院基金 (KSCX2-YW-R-119) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-06-05, 接受日期: 2008-09-11

结构形态. Q-Sepharose 柱购于 Amersham-Pharmacia Biotech; Sotemp-6500 恒温培养箱为 Fisher 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 α -synuclein 蛋白的纯化. 按文献所述的方法^[4], 以大肠杆菌 BL21[DE3] 菌株作为 pET-3a-AS 质粒的表达宿主, 在含 100 mg/L 氨苄青霉素 (ampicillin) 的 LB 培养基中(37℃)培养过夜. 继而扩大培养至 A_{600} 值为 0.3~0.4, 加入终浓度为 100 μ mol/L 的 IPTG 诱导 5 h, 离心并收集沉淀. 将每 1 L 菌液离心后的沉淀用 100 ml 冰浴渗透压休克缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, 40% 蔗糖, 2 mmol/L Na_2EDTA , pH 7.2) 悬浮样品, 室温静置 10 min 后离心(10 000 r/min, 20 min, SORVALL T21 高速离心机, Dupont 公司)并收集沉淀. 用 90 ml 预冷水悬浮样品(4℃), 加入 37.5 μ l 饱和 MgCl_2 溶液, 冰上放置 3 min, 离心(10 000 r/min, 20 min). 将上清液对缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 透析过夜后上 Q-Sepharose 柱, 以 0~0.5 mol/L NaCl 进行梯度洗脱, 收集洗脱峰并用 15% SDS-PAGE 检测, 合并只含有 18 ku 条带的蛋白质组分. 对 20 mmol/L NH_4HCO_3 透析, 冷冻干燥后置于-20℃ 备用. 其中, 离心、层析、透析均在 4℃ 进行操作.

1.2.2 糖基化 α -synuclein 样品的制备. 在终浓度为 40 g/L α -synuclein 溶液中, 分别加入葡萄糖、果糖(终浓度为 1 mol/L), 置于 37℃ 恒温培养箱中孵育. 在相同条件下, 以不加糖的 α -synuclein 作为对照. 工作溶液为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)含终浓度为 1.5 mmol/L PMSF、100 μ mol/L EDTA、0.5% sodium azide.

1.2.3 糖基化和非糖基化的 α -synuclein 蛋白的荧光分析. 在 α -synuclein 与还原糖孵育的第 0、3、6、9、12、15、18、29、41、49 天取样, 用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释 100 倍. 测定蛋白质内源荧光(λ_{ex} =280 nm; λ_{em} =300~450 nm). 同时选择激发光波长分别为 λ_{ex} =335 nm 和 λ_{ex} =370 nm, 进行发射光谱扫描 400~600 nm. 扫描速度为 60 nm/min, 激发和发射狭缝均为 5 nm, PMT voltage: 700 V, 温度 37℃, 每个数据为 3 次测量的平均值.

1.2.4 糖基化和非糖基化 α -synuclein 圆二色光谱分析. 通过远紫外区圆二色谱(circular dichroism, CD)测量糖基化和非糖基化 α -synuclein 的二级结构

变化. 在与糖孵育的不同时间段, 取糖基化和非糖基化 α -synuclein, 用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至 0.5 g/L 进行测量. 测量条件: 温度 25℃, 光径 0.1 cm, 波长宽度 1.0 nm, 收集光谱为 190~250 nm 范围, 分别进行 5 次扫描, 取平均值计算蛋白质二级结构的含量(K2D 在线软件计算).

1.2.5 电子显微镜观察. 在与糖孵育的第 38 天, 取糖基化和非糖基化 α -synuclein, 用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至 0.4 g/L. 然后将 5 μ l 样品吸附在附有碳膜并经过辉光放电的铜网上, 静置 1 min, 用滤纸吸去多余的溶液, 用双蒸水洗 2 次. 2%(质量体积比)的醋酸双氧铀负染 1 min. 在 JEM-100CX 电子显微镜下, 以 80 keV 加速电压进行检测, 再用扫描仪转换. 通过 Image-Pro Plus 6.0 软件测量颗粒直径和长度. 图像的放大倍数分别为 44 000、71 000、135 000 倍.

2 结 果

2.1 非酶糖基化过程中 α -synuclein 内源及糖基化衍生物的荧光变化

将果糖和葡萄糖分别与 α -synuclein 保温 49 天, 在不同的时间段取样, 测定其内源荧光(由于 α -synuclein 不含有 Trp 残基, 因此其内源荧光主要来源于 Tyr, λ_{ex} =280 nm; λ_{em} =308 nm). 可以观察到, 与葡萄糖孵育的 α -synuclein 其内源荧光强度呈一定程度的降低(图 1a). 当葡萄糖与 α -synuclein 保温到 30 天左右, 蛋白质内源荧光相对强度降低到最低点(图 1d). 但是, 与果糖孵育样品的内源荧光强度变化却不太明显(图 1c), 作为对照的 α -synuclein 内源荧光相对强度有一定的升高(图 1b).

值得注意的是, 当从 300 nm 到 500 nm 扫描测定内源荧光的发射光谱时, 可以观察到糖基化 α -synuclein 在 450 nm 左右出现了一个新的荧光发射峰(图 2), 其荧光强度随 α -synuclein 糖基化时间的延长而升高. 从记录到的荧光发射光谱来看, Tyr 残基所发射的荧光与 α -synuclein 糖基化所形成的荧光之间存在一定的能量转移现象, 说明 Tyr 残基与糖基化荧光发色团之间在空间距离上彼此接近.

作者确定了 α -synuclein 糖基化产物荧光的最大激发峰位于 λ_{em} =370 nm(另一处峰位于 335 nm), 而最大发射峰位于 λ_{ex} =447 nm(图 3). 在 α -synuclein 与葡萄糖和果糖分别孵育的不同时间段, 测定

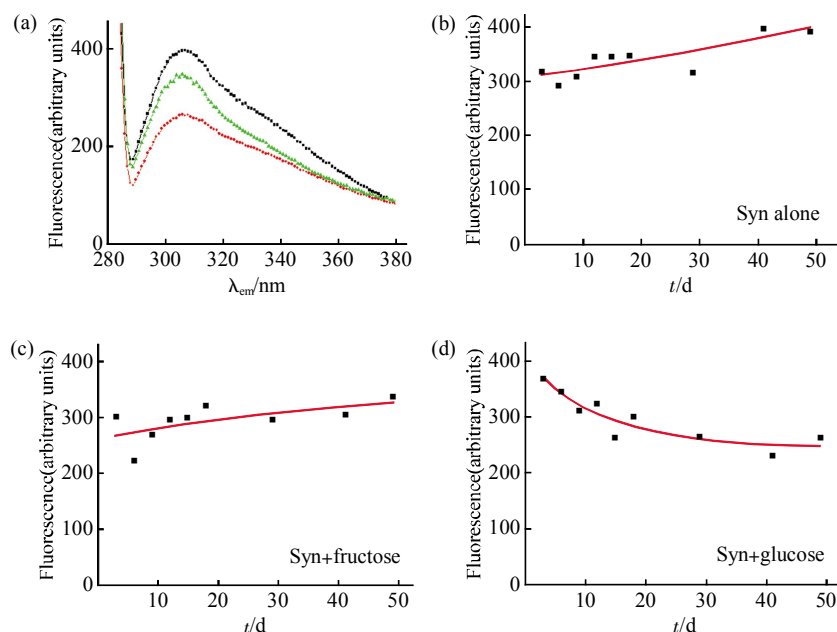


Fig. 1 Changes in the intrinsic fluorescence of α -synuclein in the presence of hexose

Changes in the intrinsic fluorescence ($\lambda_{ex}=280\text{ nm}$; $\lambda_{ex}=308\text{ nm}$) of α -synuclein were measured after incubated with fructose and glucose for 49 days as indicated (a). ■—■: Syn; ●—●: Syn+glucose; ▲—▲: Syn+fructose. During the incubation, aliquots were taken for the fluorescent measurements at different time intervals. α -Synuclein alone was used as control (b). Fructose (c) and glucose (d) were added to α -synuclein and incubated at 37°C , respectively. Aliquots were taken for the measurement of the fluorescent emission intensity as indicated at different time intervals.

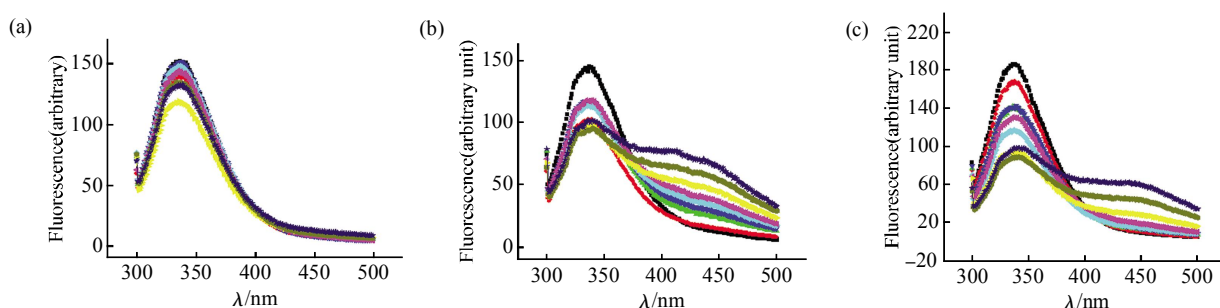


Fig. 2 Fluorescent spectra of the glycosylated α -synuclein

Conditions were referred to Figure 1, except the fluorescent spectrum was measured from 300 nm to 500 nm. α -Synuclein alone was used as control (a). The emission intensities of the protein in the presence of fructose (b) and glucose (c) at different time intervals were measured, respectively as indicated. ■—■: D3 syn; ●—●: D6 syn; ▲—▲: D9 syn; ▼—▼: D12 syn; ◆—◆: D15 syn; ◆—◆: D18 syn; ◆—◆: D29 syn; ◆—◆: D41 syn; ◆—◆: D49 syn.

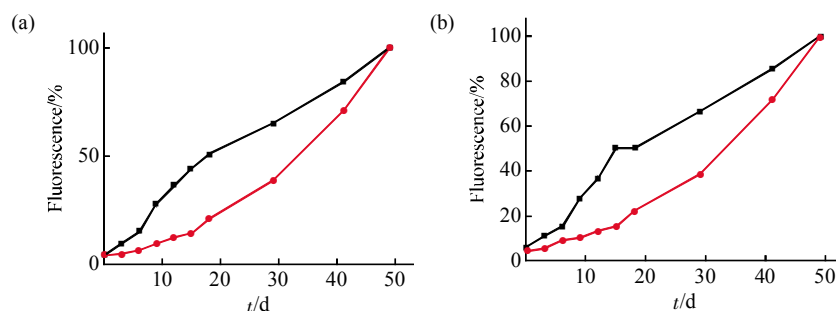


Fig. 3 Changes in the fluorescence intensities of α -synuclein by excitation at 335 nm and 370 nm during the glycation

Conditions were referred to Figure 1, except the emission intensities of glycosylated α -synuclein were measured on different days. The fluorescent emission intensities (447 nm) were detected by the excitation at 335 nm (a) and 370 nm (b), respectively. ■—■: Syn+fructose; ●—●: Syn+glucose.

447 nm 相对荧光强度的结果显示: 随着 α -synuclein 的糖基化进程, 447 nm 的荧光发射强度不断增加(图 3a). 在相同情况下测定 335 nm 激发的发射光谱强度, 也呈现出类似的变化(图 3b). 从荧光强度的增加趋势来看, α -synuclein 被果糖的糖基化速度在早期要快于葡萄糖糖基化的速度.

2.2 非酶糖基化过程中 α -synuclein 二级结构的变化

为了测定糖基化是否导致蛋白质分子的构象变化(图 4), 作者通过圆二色光谱仪测定了糖基化 α -synuclein 的椭圆度变化. 与未糖基化 α -synuclein

对照相比, 糖基化 10 天样品的椭圆度变化不明显(图 4b). 显示出 α -synuclein 没有明显的二级结构变化. 孵育第一天样品的 CD 谱, 糖基化与非糖基化 α -synuclein 之间也没有明显的差别. 当孵育 17 天之后, 糖基化 α -synuclein 的圆二色光谱出现了一定的变化(图 4c); 当孵育 34 天时光谱的差别变得更加明显(图 4d). α -synuclein 与果糖孵育的糖基化产物中的 α 螺旋从 27% 增加到了 50%(表 1), 而对照样品为 24% 左右. 以上结果表明, 与葡萄糖孵育的样品相比较, 果糖孵育 α -synuclein 分子中的 α 螺旋增加较为明显.

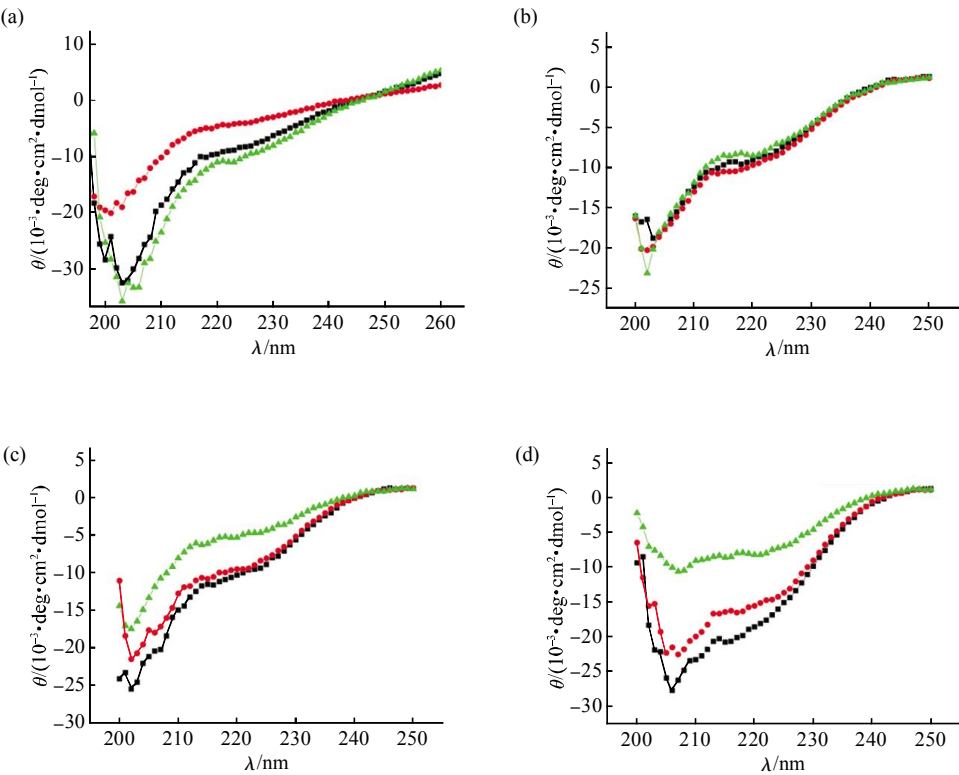


Fig. 4 CD spectra of glycated α -synuclein

Far-UV CD spectra were measured under conditions referred to Figure 1. The CD spectra of the glycated α -synuclein were measured on 0 days(a), 10 days (b), 17 days (c) and 34 days (d), respectively. ■—■: Syn+fructose; ●—●: Syn+glucose; ▲—▲: Syn.

Table 1 Content of the secondary structures calculated according to the web site of K2D

Day	0	0	0	10	10	10	17	17	17	34	34	34
Syn	+	+F	+G	+	+F	+G	+	+F	+G	+	+F	+G
α -Helix	28	28	22	27	28	28	28	28	28	24	50	35
β -Sheet	32	32	30	33	33	33	31	33	33	33	13	17
Coil	40	40	48	40	39	39	62	39	39	53	36	48

The values of content are shown in the percentage (%) of total secondary structure. D10, D17, D34 represents the incubation days of α -synuclein with fructose or glucose or α -synuclein alone as indicated. G: Glucose, F: Fructose, Syn: α -Synuclein.

2.3 糖基化 α -synuclein 的形态变化

分别将果糖和葡萄糖孵育的样品置于电子显微镜下进行观察(图 5), 可以看到糖基化 α -synuclein 的结构发生了一定的变化. 果糖孵育的样品呈现出短纤维状结构, 短纤维的平均长度为 (61.47 ± 13.66) nm,

葡萄糖孵育的样品则为 (46.98 ± 10.00) nm. 非糖基化 α -synuclein 作为对照, 其基本表现为颗粒状, 颗粒的平均直径为 (21.79 ± 3.63) nm. 以上结果显示, 糖基化可以诱导 α -synuclein 分子形成短纤维状态聚集物.

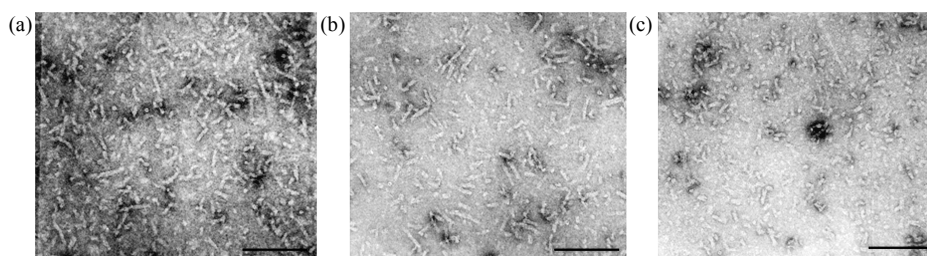


Fig. 5 Electron micrographs of glycosylated and non-glycosylated α -synuclein
 α -Synuclein was incubated with fructose (a), glucose (b) and alone (c) for 38 days. Scale bars: 200 nm.

3 讨 论

α -synuclein 是神经元中的一种重要蛋白质分子, 尽管对其生物学功能尚不十分清楚, 但是有报道认为该蛋白参与了突触的多种功能, 如神经发育、分化和神经可塑性^[15~17]. 野生型 α -synuclein 在生理条件下, 对神经细胞具有保护作用, 如参与细胞的抗凋亡分子过程等^[18]. α -synuclein 之所以备受重视, 是因为该蛋白质分子与路易小体的形成相关. α -synuclein 在胞内错误折叠聚集形成内涵体被认为是 PD 的特征病理性改变. 然而, 越来越多的研究显示, 蛋白质在体内的错误折叠、分子聚集与其转录后修饰密切相关, 如异常糖基化、磷酸化等^[19, 20]. 关于 α -synuclein 的磷酸化已经有了报道, 但是糖基化, 特别是非酶糖基化的报道相对较少. 因此, 本文作者分别采用果糖和葡萄糖作为还原糖基, 研究了 α -synuclein 的糖基化, 观察到了糖基化可以明显改变该蛋白的分子构象, 诱导二级结构的增加.

蛋白质与还原性糖在生理状态下, 不需要酶的催化即可自发地发生一系列包括 Maillard 氧化、缩和、分子重排等反应, 最终产生多种被统称为非酶糖基化终产物. 而 AGEs 源于这种羰基或双羰基化合物与蛋白赖氨酸或精氨酸残基相互作用^[21]. AGEs 大量存在于多种神经退行性疾病脑中, 包括 PD 在内的其他疾病, 如进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy)、Pick 氏病以及老年性痴呆^[13, 22, 23]. AGEs 也被证实能导致酶的活性降低和蛋白交联,

且能够诱导启动相关细胞凋亡通路^[24~29]. 本文结果显示, 果糖和葡萄糖均能够使 α -synuclein 糖基化, 并形成短纤维状聚集物, 从而显示了糖基化是 α -synuclein 聚集的一种重要诱因.

作者选择果糖和葡萄糖作为糖基化的还原糖, 是因为葡萄糖大都存在于血液和组织液, 即存在于细胞的外环境中. 果糖可以在葡萄糖进入细胞后通过生化反应转化而来. 因此, 果糖与 α -synuclein 的非酶促反应模拟了细胞质内的糖基化形式, 而葡萄糖与蛋白质反应代表了胞外的糖基化. 图 3 所示, 果糖在早期与 α -synuclein 孵育时, 糖基化的反应速度相对于葡萄糖要快. 同时, 果糖与 α -synuclein 的反应产物其 α 螺旋含量的增加十分明显. 这些结果提示, 在相同条件下, 果糖更容易与 α -synuclein 发生反应而形成糖基化衍生物. 这是由于糖基化的比率是与糖的开链形式的百分比成比例的, 而果糖的开链形式要多于葡萄糖, 所以会有更多的糖基化衍生物的形成^[30].

在本工作中, 选择了 280 nm 内源荧光进行蛋白质构象变化的检测. 该荧光由蛋白质分子内的 Tyr 残基所产生. 这是因为 α -synuclein 不含有色氨酸残基. α -synuclein 一共含有 4 个 Tyr 残基, 本实验所测定的内源性荧光为该蛋白质中所有 Tyr 残基荧光的组合. 因此, 图 1 所显示内源荧光代表了 α -synuclein 整个分子的构象变化, 而不是分子局部的构象改变指标. 这就可以理解 308 nm 内源荧光与 447 nm 特征荧光之间的能量传递现象. Tyr 残基分布在 α -synuclein 分子的不同部位, 有机会与

糖基化产物荧光发色团在空间上彼此接近。

根据以前的报道, α -synuclein 在体外可以自发聚集形成纤维状聚集体^[11], 但是在本文的实验条件下, 作者尚未观察到明显的长纤维状沉积物, 这可能是本文所采用的实验条件与所报道的有差别。另外, 糖基化 α -synuclein 的 α 螺旋含量增加的分子内机制, 尚需要进一步研究。

参 考 文 献

- Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M, *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997, **388**(6645): 839~840
- Trojanowski J Q, Lee V M. Aggregation of neurofilament and alphasynuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol*, 1998, **55**(2): 151~152
- Trojanowski J Q, Lee V M. Parkinson's disease and related neurodegenerative synucleinopathies linked to progressive accumulations of synuclein aggregates in brain. *Parkinsonism Relat Disord*, 2001, **7**(3): 247~251
- Kosaka K. Diffuse neurofibrillary tangles with calcifications: a new presenile dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994, **57** (5): 594~596
- Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res*, 1998, **8**(9): 871~880
- Polymeropoulos M H, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alphasynuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997, **276**(5321): 2045~2047
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 1998, **18**(2): 106~108
- Tofaris G K, Spillantini M G. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64** (17): 2194~2201
- Dawson T M, Dawson V L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 2003, **302**(5646): 819~822
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003, **39**(6): 889~909
- Conway K A, Harper J D, Jr, Lansbury P T. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, **39** (10): 2552~2563
- Beger K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol*, 2006, **112**(3): 237~251
- Munch G, Luth H J, Wong A, *et al.* Crosslinking of α -synuclein by advanced glycation endproducts—an early pathophysiological step in Lewy body formation?. *J Chem Neuroanat*, 2000, **20**(3~4): 253~257
- Huang C H, Ren G P, Zhou H, *et al.* A new method for purification of recombinant human α -synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, **42**(1): 173~177
- Jenco J M, Rawlingson A, Daniels B, *et al.* Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, **37**(14): 4901~4909
- Maroteaux L, Scheller R H. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res*, 1991, **11**(3~4): 335~343
- Papachroni K, Ninkina N, Wanless J, *et al.* Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha and gamma-synucleins. *J Mol Neurosci*, 2005, **25**(2): 157~164
- Sidhu A, Wersinger C, Moussa C E, *et al.* The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1035**(1): 250~270
- 李芳序, 卢 静, 许亚杰, 等. 老年性痴呆发病过程中内源性甲醛慢性损伤机制. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(4): 393~400
- Li F X, Lu J, Xu Y J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(4): 393~400
- 赫荣乔, 陈 岚, 柯 莎, 等. 多因素异常修饰导致体内蛋白质选择性错误折叠和功能丧失. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (10): 940~941
- He R Q, Chen L, Ke S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(10): 940~941
- Munch G, Schicktz D, Behme A, *et al.* Amino acid specificity of glycation and protein-AGE crosslinking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(10): 1006~1010
- Luth H J, Ogunlade V, Kuhla B, *et al.* Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex*, 2005, **15**(2): 211~220
- Reddy V P, Obrenovich M, Atwood C S, *et al.* Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox Res*, 2002, **4**(3): 191~209
- Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol*, 1992, **23**: 1~34
- Singh R, Barden A, Mori T, *et al.* Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia*, 2001, **44**: 129~146
- Vlassara H, Uribarri J. Glycooxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning?. *Rev Endocr Metab Disord*, 2004, **5** (3): 181~188
- Schmidt A M, Yan S D, Wautier J L, *et al.* Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 1999, **84**(5): 489~497
- Artwohl M, Graier W, Roden M, *et al.* Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes*, 2003, **52** (5): 1240~1247
- Kaji Y, Amano S, Usui T, *et al.* Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, **44**(2): 521~528
- Schalkwijk C G, Stehouwer C D A, van Victor W M, *et al.* Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, **20**(5): 369~382

Nonenzymatic Glycation of α -Synuclein and Changes in Its Conformation*

SHENG Zhi-Ling^{1,2,3}, LIU Yan-Ying¹, CHEN Lan¹, HE Rong-Qiao¹**

⁽¹⁾State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁽³⁾Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract During the incubation of purified α -synuclein with fructose or glucose, it was observed that the protein intrinsic fluorescence at 308 nm decreased while the fluorescence of glycated derivant at 447 nm increased. This fluorescence representing nonenzymatic glycation of α -synuclein was more rapidly formed in the presence of fructose than that of glucose. Interestingly, an energy transfer could be observed from the intrinsic fluorescence to the nonenzymatic glycating fluorescence, suggesting a near distance between Tyr residues and the nonenzymatic glycated derivant. Experiments using circular dichroism showed that the content of α -helix of nonenzymatic glycated α -synuclein was increased during the nonenzymatic glycation, especially incubated with fructose. The nonenzymatic glycated α -synuclein was in some rod-like filaments under the electronic microscope. That is to say, nonenzymatic glycation induces the conformational changes of α -synuclein which is more vulnerable to the nonenzymatic glycation of fructose. It appears that nonenzymatic glycation induces α -synuclein misfolding and probably aggregation in cell.

Key words nonenzymatic glycation, α -synuclein, molecular conformation, characteristic fluorescence, molecular aggregation, neurodegeneration

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(90206041, 30570536), National Basic Research Program of China(2006CB500703) and Innovation Grant of CAS (KSCX2-YW-R-119).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: June 5, 2008 Accepted: September 11, 2008