

中图分类号: Q615

单位代码: 10425

学 号: Z20140018



中國石油大學

硕士学位论文

Master Degree Thesis of China University of Petroleum
(专业学位)

α -突触核蛋白与脂质膜间相互作用的分子模拟研究
Molecular Simulation Study on the Interaction between
 α -Synuclein and Lipid Membrane

学科专业: 材料与化工

研究方向: 新能源材料

作者姓名: 齐自强

指导教师: 张军 教授

二〇二三年五月

Molecular Simulation Study on the Interaction between α -Synuclein and Lipid Membrane

A Thesis Submitted for the Professional Degree of Master

Candidate: Ziqiang Qi

Supervisor: Prof. Jun Zhang

School of Materials Science and Engineering

China University of Petroleum (East China)

学位论文答辩委员会

答辩时间	2023 年 05 月 19 日		
答辩地点	中国石油大学（华东）古镇口校区山能新能源大厦 236 教室		
答辩委员会组成			
组成	姓名	职称	工作单位
主席	薛庆忠	教 授	中国石油大学（华东）
委员	陈守刚	教 授	中国海洋大学
	鲁效庆	教 授	中国石油大学（华东）
	孙金全	教 授	山东科技大学
	赵 文	副教授	中国石油大学（华东）

关于学位论文的独创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在指导教师指导下独立进行研究工作所取得的成果，论文中有关资料和数据是实事求是的。尽我所知，除文中已经加以标注和致谢外，本论文不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含本人或他人为获得中国石油大学（华东）或其它教育机构的学位或学历证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对研究所做的任何贡献均已在论文中作出了明确的说明。

若有不实之处，本人愿意承担相关法律责任。

学位论文作者签名： 齐自纯

日期：2023 年 06 月 01 日

学位论文使用授权书

本学位论文作者完全了解中国石油大学（华东）有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许本学位论文被查阅和借阅。本人授权中国石油大学（华东）可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印、扫描或其它手段保存和汇编本学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 齐自纯

日期：2023 年 06 月 01 日

指导教师签名： 张军

日期：2023 年 06 月 01 日

摘 要

帕金森病 (PD) 作为一种神经退行性疾病, 其发病机制与大脑受累区域存在的路易小体有关, 路易小体的主要成分包括脂质和 α -突触核蛋白 (α -Syn) 聚集体。 α -Syn 是一种内禀无序蛋白, 主要存在于突触前神经元的轴突末端。越来越多证据表明 α -Syn 的正常功能与突触小泡运输相关; 发生病理性转变后, 其寡聚体与原纤维对神经系统有毒性。随着生物体的老化, 生物膜中的短酰链磷脂和胆固醇的含量增加, PD 的发病率也明显提高。目前也有证据证明 α -Syn 的膜相互作用与其正常功能以及病理性聚集密切相关。这表明, 脂质组学的改变可能是 PD 的潜在原因。

生物膜中磷脂酰链缩短和胆固醇都可能影响 α -Syn 的膜结合及其异常聚集, 但其机制尚不清楚; 膜结合后, α -Syn 低聚物形成 (聚集) 的微观机理也还不清楚。因此, 本文利用分子动力学模拟研究了 α -Syn 和脂质膜之间的相互作用, 揭示了 α -Syn 的膜结合驱动力, 探索了酰链缩短和胆固醇对膜结合的影响, 对膜结合后 α -Syn 的聚集过程进行了深入研究。研究结果如下:

(1) 研究结果证明了膜结合过程中库仑相互作用和疏水相互作用的协同作用。磷脂酰链缩短导致脂质堆积缺陷的增加促进了 α -Syn 的膜结合, 但是同时也引起膜表面电势的下降, 减少了 α -Syn 与脂质膜的接触。

(2) 胆固醇提供了与 α -Syn 的额外氢键相互作用; 但同时胆固醇也可以削弱 α -Syn 与脂质膜之间的库仑相互作用和疏水相互作用。此外, 胆固醇通过缩小脂质堆积缺陷和降低脂质流动性来缩短 α -Syn 的膜结合区。

(3) α -Syn 的膜相互作用以及膜结合都会促进 β -sheet 的形成, 这主要是因为膜结合阻断了 N 末端结构域 (NTD) 与其他两部分的接触, 促进了非淀粉样蛋白区域 (NAC) 以及 C 末端结构域 (CTD) 的折叠, 促进了 β -sheet 的形成。 α -Syn 膜结合使得脂质膜形成富含不饱和脂肪酸的结构域。对膜结合 α -突触核蛋白聚集的研究表明, α -突触核蛋白主要通过 NAC 结构域来实现聚集, 其中 NAC 结构域之间、NAC 结构域和未结合 NTD 结构域的相互作用是聚集最主要的驱动力。

本文的结果为 α -Syn 的膜结合以及聚集提供了更多的微观信息, 有望促进构建脂质组学与 α -Syn 病理学之间的桥梁。

关键词: α -突触核蛋白; 生物膜; 膜结合; 胆固醇; 分子动力学模拟

Abstract

Parkinson's disease (PD), as a neurodegenerative disease, its pathogenesis is related to the presence of Lewy Body in the affected areas of the brain. The main components of Lewy corpuscles include lipids and α -Synuclein (α -Syn) aggregate. α -Syn is an intrinsic disorder protein, which mainly exists in the axon terminals of presynaptic neurons. More and more evidence shows that α -Syn's normal function is related to synaptic vesicle transport; After pathological changes, its oligomers and fibrils are toxic to the nervous system. With the aging of organisms, the content of short acyl chain phospholipids and cholesterol in biological membranes increases, and the incidence rate of PD also increases significantly. There is also evidence to prove that the membrane interaction of α -Syn is closely related to its normal function and pathological aggregation. This suggests that the change of lipomics may be the potential cause of PD.

Both shortening of phospholipid acyl chain and cholesterol in lipid membrane may affect α -Syn membrane binding and abnormal aggregation, but its mechanism is still unclear. After membrane binding, The microscopic mechanism of α -Syn oligomer formation (aggregation) is also unclear. Here, using molecular dynamics simulation, we have studied the interaction between α -Syn and lipid membrane, revealed α -Syn's membrane binding driving force, explored the effect of acyl chain shortening and cholesterol on membrane binding, and α -Syn's aggregation process has been deeply studied. The research results are as follows:

(1) We have proved the synergism of coulomb interaction and hydrophobic interaction in the membrane binding process. The increase of lipid packing defect caused by the shortening of phospholipid acyl chain promotes α -Syn membrane binding, but at the same time, it also causes the decrease of membrane surface potential, which hinders α -Syn contact with lipid membrane.

(2) Cholesterol provides additional hydrogen bond interaction with α -Syn; however, the coulomb interaction and hydrophobic interaction between α -Syn and lipid membranes could be weakened by cholesterol. In addition, cholesterol leads to the shrinking of lipid packing defects and the decrease of lipid fluidity, thereby shortening the membrane binding region of

α -Syn.

(3) α -Syn's membrane interaction and membrane binding will promote the formation of β -sheet, which is mainly because membrane binding blocks the contact between NTD domain and other two parts, promotes the folding of NAC and CTD domains, and promotes the formation of β -sheet. α -Syn membrane binding makes the lipid membrane form a domain rich in unsaturated fatty acids. Membrane binding studies on α -Syn aggregation showed that, α -Syn aggregates mainly through the NAC domain. The interaction between NAC domains and between NAC domains and unbound NTD domains is the main driving force for aggregation.

Our results provide more microscopic information for the membrane binding and aggregation of α -Syn, and are expected to promote the bridging between lipomics and α -Syn pathology.

Key words: α -Synuclein; Biomembrane; Membrane binding; Cholesterol; Molecular dynamic simulation

目 录

摘要	i
Abstract	ii
第 1 章 绪论	1
1.1 帕金森病与 α -突触核蛋白	1
1.1.1 帕金森病与路易小体	2
1.1.2 α -突触核蛋白	3
1.1.3 α -突触核蛋白的功能	4
1.1.4 α -突触核蛋白的病理转变与聚集	6
1.2 α -突触核蛋白的膜相互作用	7
1.2.1 生物膜及脂质组学	7
1.2.2 α -突触核蛋白的膜结合	8
1.2.3 膜组分对 α -突触核蛋白的影响	9
1.2.4 膜相互作用对 α -突触核蛋白聚集的影响	10
1.3 α -突触核蛋白的分子动力学模拟研究	13
1.3.1 分子动力学模拟简介	13
1.3.2 分子动力学模拟在 α -突触核蛋白研究中的应用	13
1.4 本论文选题目的及意义	15
第 2 章 研究方法与方案	17
2.1 全原子分子动力学模拟	17
2.2 研究方案	17
2.2.1 模型构建	17
2.2.2 模拟参数设置	19
2.2.3 研究思路	19
第 3 章 酰链缩短对 α -突触核蛋白膜相互作用的影响	21
3.1 模型构建	21
3.2 酰链缩短对 α -突触核蛋白膜亲和力的影响	21
3.3 α -突触核蛋白膜结合过程的微观机制	24

3.4 酰链缩短对磷脂膜性质的影响	28
3.5 酰链缩短引起 α -突触核蛋白聚集	30
3.6 本章小结	32
第 4 章 胆固醇对 α -突触核蛋白膜相互作用的影响	34
4.1 模型构建	34
4.2 胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合的影响	34
4.3 胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合倾向的多方面影响	36
4.3.1 库仑相互作用	38
4.3.2 脂质堆积缺陷	38
4.3.3 氢键相互作用	38
4.4 胆固醇缩短 α -突触核蛋白膜结合区域的机制	39
4.5 胆固醇对 α -突触核蛋白构象和二级结构的调节	40
4.6 本章小结	43
第 5 章 α -突触核蛋白膜结合后在膜上的聚集及对膜的影响	44
5.1 模型构建	44
5.2 全长 α -突触核蛋白的膜结合	45
5.3 α -突触核蛋白在脂质膜上的聚集	48
5.3.1 聚集对脂质膜的影响	48
5.3.2 聚集对 α -突触核蛋白的影响	50
5.4 本章小结	52
第 6 章 结论与展望	54
参考文献	56
攻读硕士学位期间取得的研究成果	68
致 谢	69

第 1 章 绪论

1.1 帕金森病与 α -突触核蛋白

帕金森氏病（帕金森病）是一种进行性神经退行性疾病，在全世界范围内至少影响着 400 万人。帕金森病以严重的运动症状为特征，包括无法控制的震颤、运动缓慢和僵硬，姿势失衡等。帕金森病的病理特征主要为黑质致密部产生多巴胺的神经元（多巴胺能神经元）显著丢失，导致纹状体中多巴胺的急剧枯竭，也会影响到其他神经系统，但影响程度较轻。除了与环境危险因素密切相关的散发性帕金森病外，还有各种家族性的疾病，患者之间的发病年龄、疾病进展速度和症状的具体状况也有所不同。到目前为止，导致细胞死亡的途径仍不清楚，关于遗传因素和环境因素的影响程度尚不明确，导致至今其致病机制也没有明确定论^[1]。

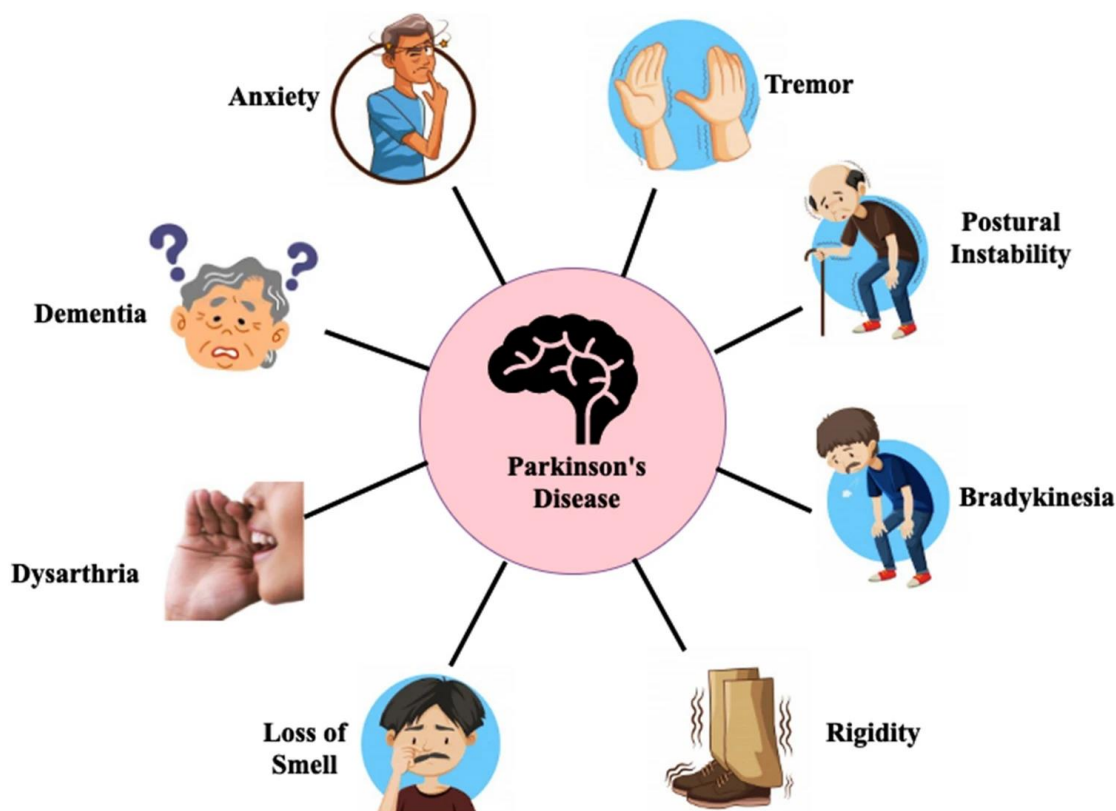


图 1-1 帕金森病症状^[2]

Figure 1-1 Symptoms of Parkinson's disease^[2]

帕金森病具有不断发展的复杂性。长期以来，它一直以与路易小体相关的帕金森病的经典运动特征和黑质中多巴胺能神经元的丧失为特征。然而，现在帕金森病的症状被认为是异质的，在临床上具有显著的非运动特征；而且，它的病理学涉及神经系统的广

泛区域、各种神经递质和蛋白质聚集体，而不仅仅是路易体。帕金森病的病因仍然未知，但人们不再将环境因素视为导致帕金森病的主要原因。相反，帕金森这种疾病似乎是遗传和环境因素共同作用所导致的，并且许多基本细胞过程都会受到影响。由于帕金森病的复杂性，目前临床上无法在疾病的早期阶段做出明确诊断，也难以缓解后期阶段的严重症状。此外，目前还没有成熟的减缓神经退行性过程的治疗方法^[3]。

最近的研究结果表明，许多以前被归为一类并被称为特发性的病例可能有不同的潜在病因^[4]。虽然从突变基因到神经退化的具体作用过程的相关研究才刚刚开始进行，但在一些病例中，明确的遗传影响已经被识别出来^[4, 5]。在没有明确遗传影响的患者中，致病机制更难理解，并且涉及一系列因素，包括环境毒素、氧化应激和线粒体功能障碍^[6]。目前，帕金森病神经退行性病变的解剖分布为这种疾病中黑质神经元丧失的致病机制提供了重要线索，并表明这些细胞死亡的共同途径可能都涉及多巴胺依赖的氧化应激。目前的研究结果提出了更多可能，但是路易小体相关的致病原因仍然是帕金森病研究的重点之一。而且路易小体与基因突变等遗传因素的关系也被进一步证明。

1.1.1 帕金森病与路易小体

路易小体是一种独特的神经元包涵体，常见于帕金森氏病的黑质和其他特定脑区（主要是神经元过度丢失的地方）。路易小体常出现在一些老年人身上，很少出现在其他中枢神经系统退行性疾病中。相关的病理结果表明，一些偶发性路易体病是帕金森病的症状前病例。而且，对路易体病的相关研究证实了年龄（时间）在疾病演变中的重要性。鉴于这种疾病的普遍和广泛的发生，有人认为在路易体和帕金森病的发病机制中，疾病早期的内源性机制可能比环境因素更重要^[7]。

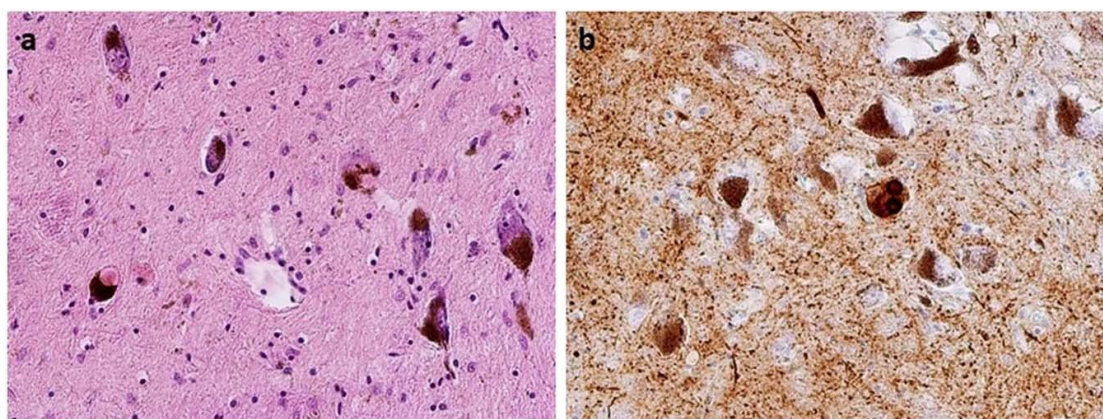


图 1-2 路易小体染色图^[8]

Figure 1-2 Chromatic diagram of lewy body^[8]

路易小体是由一个看起来中等密度的内核和一个由径向取向的细丝组成的外区组成，其他更复杂的路易小体形式称为多层路易小体，这种路易小体有一个致密的核心，周围有多个密度可变的同心薄板。不同类型的路易小体富含以高度特异性方式组织的丝状结构。路易小体通常发现于脑干，被称为经典路易小体。有研究表明，核心是细丝相交并密集堆积的区域^[9]。也有人认为，致密的泡状结构和其他分子（例如脂质）也积累在核心^[10]。目前的实验观察表明，路易小体不是由单一的蛋白质组成，而是含有蛋白质、脂类、丝状结构、金属离子和细胞器的复杂混合物。

自发现以来，路易小体中细丝的存在一直是最一致的观察结果之一。然而，形成这些细丝的蛋白质种类几十年来一直存在争议。鉴于路易小体辐射结构的丝状性质以及神经丝在当时阿尔茨海默病病理中与神经纤维缠结形成的关系，人们假设路易小体是由神经丝组成的，或者说，神经丝参与了它们的形成。在发现 α -突触核蛋白疾病相关突变并确定 α -突触核蛋白是路易小体的关键成分之前，泛素和神经丝成分被认为是路易小体相关的两种主要蛋白质^[11-16]。随后的研究显示，针对神经丝的抗体对路易小体缺乏染色或染色微弱，这表明，尽管可能存在神经丝，但它们不是路易小体中主要的丝状结构^[16]。最后在 1997 年，抗 α -突触核蛋白 N 末端和 C 末端抗体免疫染色的结果表明路易小体是由全长 α -突触核蛋白组成的^[17]，从而确定了 α -突触核蛋白是路易小体的关键成分。同时他们提出，与疾病相关的突变 A53T 可以促进 α -突触核蛋白聚集成细丝，也进一步确定了 α -突触核蛋白在路易小体和帕金森病中的重要性。

1.1.2 α -突触核蛋白

α -突触核蛋白是一种小的突触前外周膜蛋白，在中枢神经系统中高度表达，约占整个胞浆蛋白含量的 0.5%~1.0%。其纤维状形态被定义为路易小体(LB)和路易神经节(LN)的主要成分，并且和其他蛋白质和脂类一起在细胞内沉积，这被认为是帕金森病和其他相关神经疾病的特征之一^[9, 17]。 α -突触核蛋白是突触核蛋白家族的一员，在大脑中丰富存在，是一种 140 个氨基酸长度的内禀无序蛋白，主要定位于大脑中神经细胞的突触前末梢^[18]，能够与磷脂膜结合^[19]。在正常生理条件下， α -突触核蛋白保持单体的无序形式，没有任何二级结构，并包括三个不同的区域^[20]：两亲性 N 末端(NTD)区域(残基 1-60)、一个被称为非淀粉样蛋白成分(NAC)的主要疏水区(残基 61-95)以及一个酸性的富含脯氨酸的 C 末端(CTD)区域(残基 96-140)。另外一种划分的 N 端结构域包含整个 NTD 区域以及 NAC 区域的一部分(前 87 个残基)，是一个带正电的区域，而且其

中有 7 个包含 11 个氨基酸的重复序列。该重复序列包含一个高度保守的 KTKEGV 六聚体基序，该基序也存在于载脂蛋白的 α -螺旋结构域中。这表明 α -突触核蛋白可以和载脂蛋白一样与脂质发生结合。此外， α -突触核蛋白通过诱导 α -螺旋的形成，从而减少形成 β -结构的倾向，进而降低破坏脂双层的能力，这都与其重复序列有关。而且目前的遗传学证据表明， α -突触核蛋白在帕金森病和路易体痴呆的发病机制中起着直接作用^[21]。

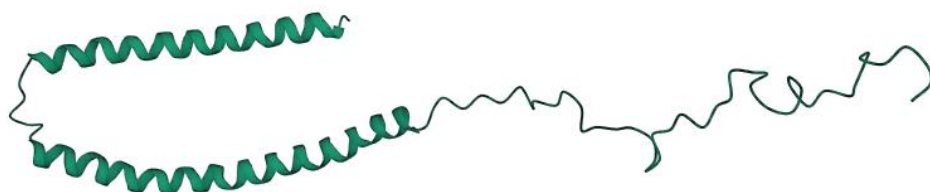


图 1-3 胶束结合的 α -突触核蛋白^[22]

Figure 1-3 Micellar-bound α -Synuclein^[22]

1.1.3 α -突触核蛋白的功能

α -突触核蛋白的生理功能目前还不清楚。但是已知它可以与多种蛋白质和细胞成分相互作用^[23]。目前猜测 α -突触核蛋白的功能涉及脂质运输、脂质堆积和膜生物发生： α -突触核蛋白能够与脂肪酸发生结合并且参与脂质在细胞质和膜室之间的运输^[24]。作为一种脂质结合蛋白，Varkey 等人还发现 α -突触核蛋白可以诱导膜弯曲，将曲率较小的小泡转化为高度弯曲的小泡^[25]；此外， α -突触核蛋白被发现是磷脂酶 D1 和 D2 的抑制剂；这表明它可以诱导膜重塑并且参与了膜生物发生^[26]。

目前有三个观察结果共同指向了另一种关于 α -突触核蛋白生理功能的猜测： α -突触核蛋白可能作为分子伴侣与其他细胞内蛋白相结合。第一， α -突触核蛋白与分子伴侣蛋白家族具有结构和功能同源性^[27]；第二， α -突触核蛋白能够通过其 C 末端抑制热变性蛋白质的聚集能力^[28]，此外 α -突触核蛋白过表达似乎可以保护多巴胺能神经元免受氧化应激和细胞凋亡的影响^[29]；第三， α -突触核蛋白能够直接结合 SNARE 复合体并促进其聚合来挽救致命的神经退化^[30, 31]。这些证据都表明 α -突触核蛋白作为分子伴侣参与生物过程发挥作用。

有证据表明 α -突触核蛋白也可能参与了囊泡运输过程：在酵母中， α -突触核蛋白能够抑制内质网-高尔基体运输^[32]，而且可以通过诱导 RAB 蛋白聚集，导致内体运输缺陷^[33]。在人体中 α -突触核蛋白干扰内质网-高尔基体贩运^[34]，而且涉及帕金森病的突变会加剧这种影响^[35]。

另一个关于 α -突触核蛋白生理功能的猜测是，它能够调控多巴胺的合成和转运： α -突触核蛋白会阻碍酪氨酸羟化酶（TH）的磷酸化并且稳定去磷酸化的非活性 TH^[36]， α -突触核蛋白似乎能够通过抑制 TH 的表达和活性来抑制多巴胺的合成^[37]。事实上，观察到黑质中 α -突触核蛋白的年龄相关性增加与 TH 的表达呈负相关^[38]。此外，研究证明， α -突触核蛋白的数量会对囊泡单胺转运蛋白 2（VMAT2）产生影响。VMAT2 是一种将单胺类神经递质从胞浆转运到突触小泡的膜蛋白。 α -突触核蛋白的过表达将会抑制 VMAT2 的活性，打破多巴胺的动态平衡，使胞液中多巴胺的水平上升^[39]。这些研究进一步加强了 α -突触核蛋白与帕金森病之间的联系。

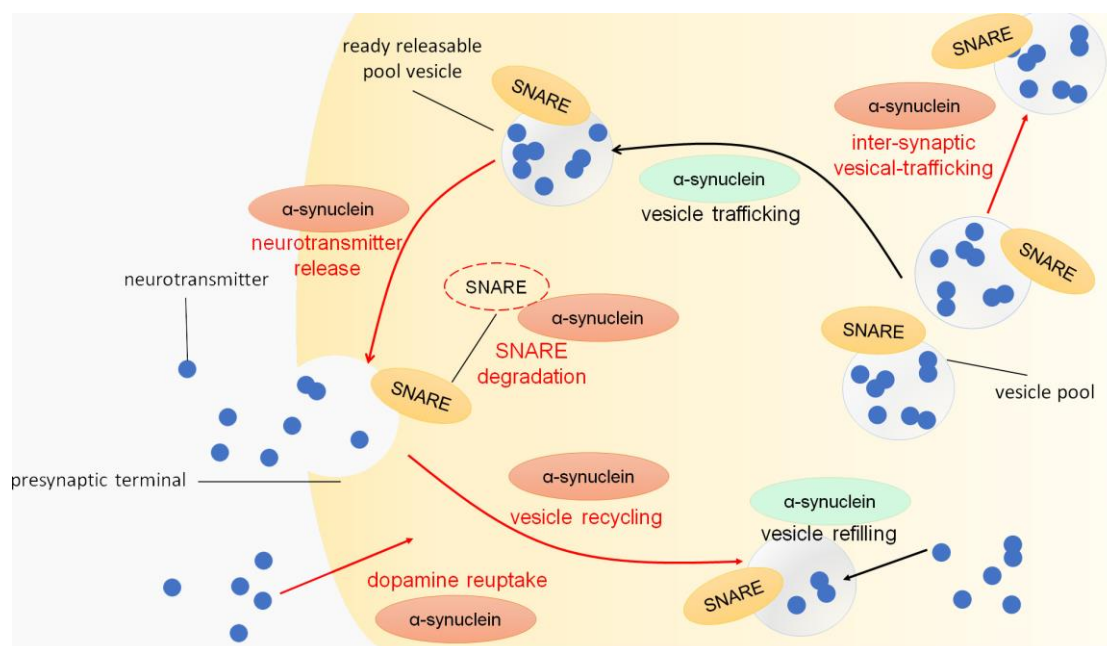


图 1-4 α -突触核蛋白的生理功能图示^[40]

Figure 1-4 Physiological function diagram of α -Synuclein^[40]

最后一个猜测是， α -突触核蛋白在神经递质释放和突触可塑性中起作用： α -突触核蛋白主要分布在突触前，它会与突触小泡发生相互作用并且能够作为分子伴侣参与膜生物发生，这些都提示 α -突触核蛋白可能参与神经递质的释放和突触可塑性。但是相关的研究结果相互矛盾：一方面，有实验证明 α -突触核蛋白在突触前终末具有高度的移动性^[41]，并且 α -突触核蛋白能够调节突触间突触小泡的移动，并帮助小泡回收^[42]。另一方面， α -突触核蛋白能在突触水平上组织成多聚体，而这导致小泡聚集，随后限制小泡的运动，这反过来又减少了内吞和胞吐过程^[43]。体外研究表明， α -突触核蛋白在不阻碍与突触后膜融合的情况下抑制小泡对接^[44]，而 α -突触核蛋白的过表达导致小泡的停靠并且

在突触处积累^[45]。因此， α -突触核蛋白对神经递质释放的影响是通过调节突触前的囊泡储备而不是通过直接影响释放机制来实现的。

目前对于 α -突触核蛋白的生理功能有大量的猜测也有了很很多相关的研究，但是由于其涉及的生物过程的复杂性以及相互作用物质的广泛性，导致其生理功能还没有一个明确的定论。但毫无疑问的是， α -突触核蛋白会与生物膜以及其他蛋白质发生相互作用并且发挥其生理功能，影响细胞内以及细胞之间的多个生物过程。其病理转变导致的生理功能的丧失可能是帕金森病等一些神经退行性疾病的潜在因素之一。

1.1.4 α -突触核蛋白的病理转变与聚集

α -突触核蛋白的异常聚集和纤维化是许多神经退行性疾病的致病标志，包括路易体痴呆以及帕金森病^[46]。 α -突触核蛋白氨基酸序列的特定点突变与遗传性帕金森病的发生有关^[47, 48]。在有帕金森病病史的家庭中，已发现一些常见的突变(如 A30P、E46K、H50Q、G51D、A53T 和 A53E 等)，每个突变都会导致蛋白质的行为和物理特性发生明显变化，很大一部分突变会引起纤维化动力学的改变^[49-56]。已知的 A30P 突变比野生型 α -突触核蛋白形成纤维的速度更慢^[57]，而 A53T 和 E46K 等突变可以在体外加速 α -突触核蛋白的聚集。

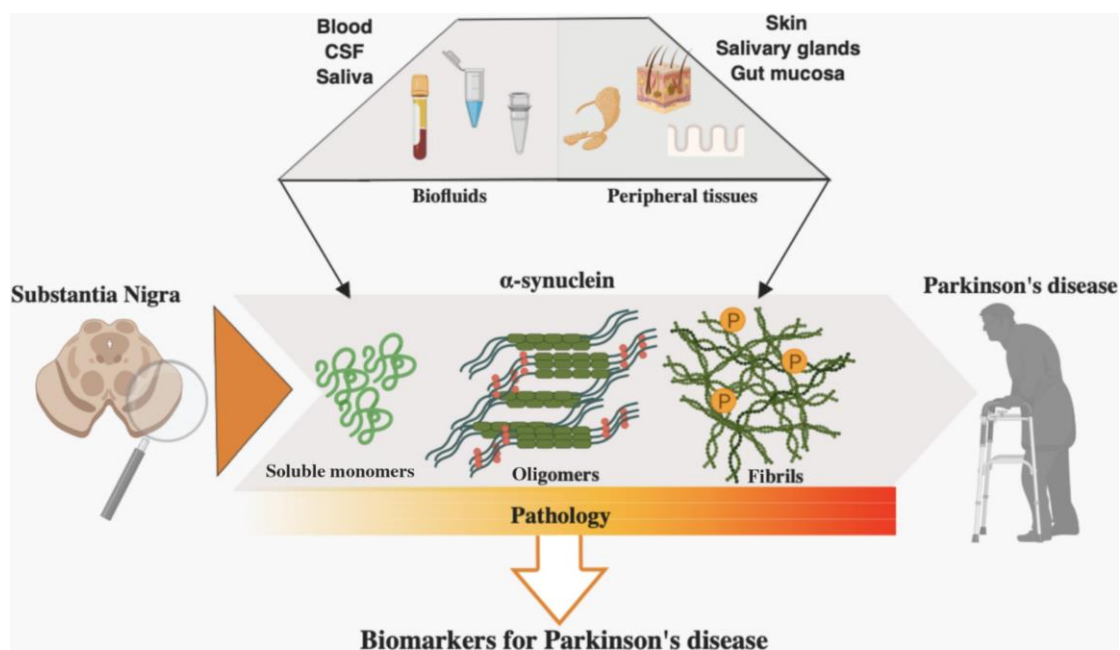


图 1-5 α -突触核蛋白的病理性转变^[58]

Figure 1-5 Pathological changes of α -Synuclein^[58]

α -突触核蛋白结构中的 NAC 区域在单体 α -突触核蛋白组装成富含 β 片层的聚集体的过程中起着至关重要的作用^[59-61]。中央疏水非淀粉样成分 (NAC) 区域因在阿尔茨海

默病患者大脑内的斑块中被识别而命名：错误折叠的 α -突触核蛋白与 β 淀粉样蛋白($A\beta$) 一起被发现于阿尔茨海默病的斑块中，但又不是淀粉样蛋白的 $A\beta$ 成分，也就因此， α -突触核蛋白此区域的名字被创造出来，以描述与阿尔茨海默病相关的斑块的一种成分^[62-63]。NAC 多肽能够自我聚集以及像 $A\beta$ 一样在大脑中播种并引起其他正常蛋白的聚集^[64-66]，这些错误折叠的物种对神经细胞是有毒的^[66]。因此，NAC 区被认为是蛋白质的高致病性区域。

α -突触核蛋白的 N 端是已被证明与脂泡紧密相关的区域^[67-71]，并且 α -突触核蛋白的 N 末端与不同组成的脂质膜之间的亲和力和结合长度都不相同，而膜结合长度增加将会减少 α -突触核蛋白在溶液中暴露部分的长度，进而影响其折叠状态。最近的一项研究表明，在有钙离子存在的情况下，C 末端也表现出与脂泡的高亲和力^[72]，这表明环境因素也会影响 α -突触核蛋白的膜相互作用。 α -突触核蛋白与脂质之间比例的不同也会导致其聚集状态的改变，也有研究表明 α -突触核蛋白与生物膜的亲和力和其聚集之间存在一定的联系。这些证据都表明 α -突触核蛋白的膜相互作用与其病理转变也有一定的相关性，并且脂质组成以及环境因素都会对这一过程产生不可忽视的影响。

1.2 α -突触核蛋白的膜相互作用

1.2.1 生物膜及脂质组学

膜，在生物学中是形成活细胞或内部细胞室外边界的薄层。细胞的外边界是质膜，细胞内部由膜封闭的隔室称为细胞器。生物膜具有三个主要功能：(1) 阻止有毒物质进入细胞；(2) 膜上存在受体和通道，能允许特定分子，如氨基酸等营养素、离子以及代谢产物通过，介导细胞内（细胞器之间）和细胞与外部环境之间物质传递；(3) 分隔细胞器内进行的一些重要并且不可相互接触的代谢过程。膜主要由脂质双层构成，其上也包含着大量的蛋白质。脂质双层是由磷脂、胆固醇以及糖脂分子所构成的双层膜，磷脂是其中的主要成分。脂质使细胞膜能够发生形变并且具有一定的流动性，其稠度接近于轻油。双层膜中的脂肪酸链能够允许许多小的脂溶性分子（例如氧气）渗透膜，但它们会阻碍大的水溶性分子（例如糖）和带电离子（例如钙离子）穿过膜。脂质和脂类代谢物在细胞、组织和生物体液的结构和功能中扮演着多种角色并且对生命体至关重要。脂质组学是代谢组学的一个分支，它包括对脂类及其在健康和疾病中的生物功能的全球性研究，包括识别各种疾病的诊断、预后、预防和治疗反应的生物标志物。

1.2.2 α -突触核蛋白的膜结合

α -突触核蛋白通常是以（单体）胞浆蛋白的形式从脑提取液中纯化出来的，而不是作为突触小泡的组成部分^[73]，这表明它并不是一种膜蛋白，或者说不会一直与脂质膜结合。然而，在生理条件下分离突触体时，免疫电子显微镜证实了 α -突触核蛋白的囊泡结合特性，并表明大多数（74.2%）免疫金标记的 α -突触核蛋白分子位于突触终末的突触小泡表面^[74]。上文（1.1.2 节）中我们已经提到 α -突触核蛋白对脂膜的这种瞬时亲和力的实现在于 α -突触核蛋白的结构。首先，NTD 结构域包含多个 11 个氨基酸的不完美重复序列，会形成一个两亲性 α -螺旋，类似于载脂蛋白并能与脂质膜发生结合并且可以穿透脂质膜^[75, 76]。其次，NAC 结构域倾向于形成富含 β -sheet 的低聚构象并且非常易于聚集^[60, 62, 77]。该区域还包含 KTKEGV 共有序列的元件，与 NTD 结构域一起，大约三分之二的整个蛋白质可以在脂结合时形成 α -螺旋。另外，带负电荷的 CTD 结构域在钙离子存在的情况下也可以与脂质膜结合^[72]。 α -突触核蛋白序列的这些内在条件以及要结合的脂膜的性质，包括疏水性、电荷或膜曲率，都有可能调节 α -突触核蛋白的膜结合。

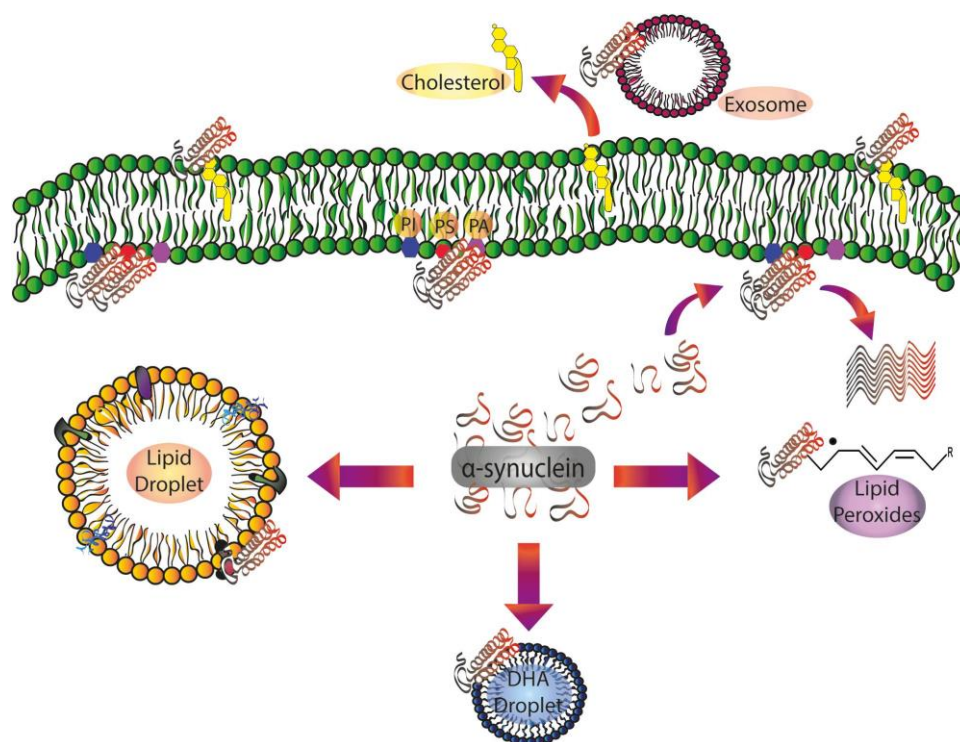


图 1-6 α -突触核蛋白与脂质膜的结合示意图^[78]

Figure 1-6 Schematic diagram of α -Synuclein binding to lipid membrane^[78]

α -突触核蛋白序列中的三个不同结构域与脂膜相互作用不同^[79]。N 末端区域的 α -螺旋（aa6-25）在第一次接触时以高亲和力将 α -突触核蛋白锚定在膜表面，而不考虑脂质成分。中心区域（aa26-97）与不同性质的脂质膜结合的长度不同，这取决于脂质的组

成, 并且这表明了一个潜在的作用, 即“膜性质传感器”。C 末端区域(aa98-140)与膜的相互作用很弱, 表现出高度的动态性, 独立于其他区域。因此, 可以说 α -突触核蛋白的中央区域(aa26-97)决定了其与脂类的结合能力。有趣的是, 所有导致早发或晚发帕金森病的家族性突变(A30P、E46K、H50Q、G51D、A53T、A53E)都位于这个关键序列中, 这可能会影响膜亲和力的特异性或影响 N 末端的锚定。

确实发现一些致病的 α -突触核蛋白突变减少了其脂结合行为, 例如 G51D 和 A30P, 特别是螺旋断裂突变 A30P 的作用最强^[56]。A30P 突变进一步被发现对 N 末端锚定产生负面影响, 原因是 A30P 突变的 α -突触核蛋白与小单层囊泡的结合亲和力大幅降低^[80]。然而, 对于早发性帕金森病突变体 E46K, 观察到的情况正好相反。N 末端锚定区(aa6-25)延伸到 aa42, 从而增加了膜的亲和力。不同突变引起的脂结合行为的变化可能都会导致 α -突触核蛋白的病理性聚集, 但是其作用机制存在很大的差异。

1.2.3 膜组分对 α -突触核蛋白的影响

膜相互作用在 α -突触核蛋白的生理功能中扮演着重要的角色, 同时也与 α -突触核蛋白的病理性转变密切相关。目前发现的一系列现象表明, 脂质膜组分会影响 α -突触核蛋白的膜亲和力进而影响其构象。例如, α -突触核蛋白表现出对阴离子脂类的高亲和力; 膜结合后形成的两亲性 α -螺旋在不同组分的脂质膜中表现出不同的构象, 现已观察到存在超过 90aa 长的延伸的 α -螺旋或者两个被截断的短的 α -螺旋^[69, 81, 82]; α -突触核蛋白优先与直径类似于突触小泡的小单层囊泡结合^[83], 而膜组分是膜曲率的决定性因素之一。

脂质调节 α -突触核蛋白生理性多聚体的形成或诱导 α -突触核蛋白病理性聚集的机制尚不清楚。目前几项研究通过分析生物膜或脂类的物理和化学性质, 进而探讨了它们如何影响 α -突触核蛋白的聚集倾向。已发现在水溶液中具有高溶解性和短酰链的脂类会促进 α -突触核蛋白淀粉样纤维的形成^[84]。进一步研究发现, 具有高 GM1 和 GM3 神经节苷脂浓度的体外环境加速了 α -突触核蛋白的聚集^[85, 86]。同样, 氧化的胆固醇代谢产物, 被发现在路易体病患者的大脑中增加, 进而导致 α -突触核蛋白的纤维化^[87]。体外实验还表明, 多不饱和脂肪酸单独或与磷脂酯化均可促进 α -突触核蛋白寡聚体的形成以及细胞毒性, 而饱和脂肪酸可降低 α -突触核蛋白寡聚体的水平^[88-90]。

α -突触核蛋白在几个帕金森病相关细胞培养系统和体内的过度表达导致甘油二/三酯水平升高, 不饱和脂肪酸浓度增加, 尤其是油酸^[91]。这种脂类组成的变化伴随着 α -突触核蛋白的聚集以及磷酸化 α -突触核蛋白的数量和细胞毒性的增加。膜中油酸类脂质

的富集会增强膜的流动性，并影响膜的曲率。而且油酸水平的增加使 α -突触核蛋白膜结合的速率增加，从而介导了 α -突触核蛋白的毒性^[91]。通过靶向酶活性控制来调节脂质组分是一种很有前途的治疗策略，目前也有研究证明，这种方法能够降低人类诱导多能干细胞神经元模型中 α -突触核蛋白的毒性^[92]。这些数据表明，不同类别的脂质能够诱导与疾病相关的 α -突触核蛋白的错误折叠。尽管目前相关生物学背景还不完备，但毫无疑问的是，脂类在突触核病的发生中发挥重要作用。

1.2.4 膜相互作用对 α -突触核蛋白聚集的影响

不仅膜组分会影响 α -突触核蛋白的膜结合以及聚集过程，而且外部环境、脂质/ α -突触核蛋白比率都会对 α -突触核蛋白的聚集产生影响，并且这些因素对于不同突变类型的 α -突触核蛋白的影响也不尽相同。

基于氨基酸交换的膜亲和力降低或增强会影响 α -突触核蛋白形成异常聚集的倾向。首先， α -突触核蛋白的聚集动力学取决于溶液条件的不同，其中 pH 的影响最大^[93]。在 pH 为 6.5 的负电荷脂泡存在下进行的聚集动力学实验表明，脂质诱导的聚集速率的改变对于不同的 α -突触核蛋白突变体也会有差异^[48]。在这组实验中，只有 A53T 突变对初始聚集体的形成有明显的促进作用，而 A30P 仅略有增加，而 E46K 与野生型相比要慢得多。此外，这些突变对原纤维伸长过程的影响很小。

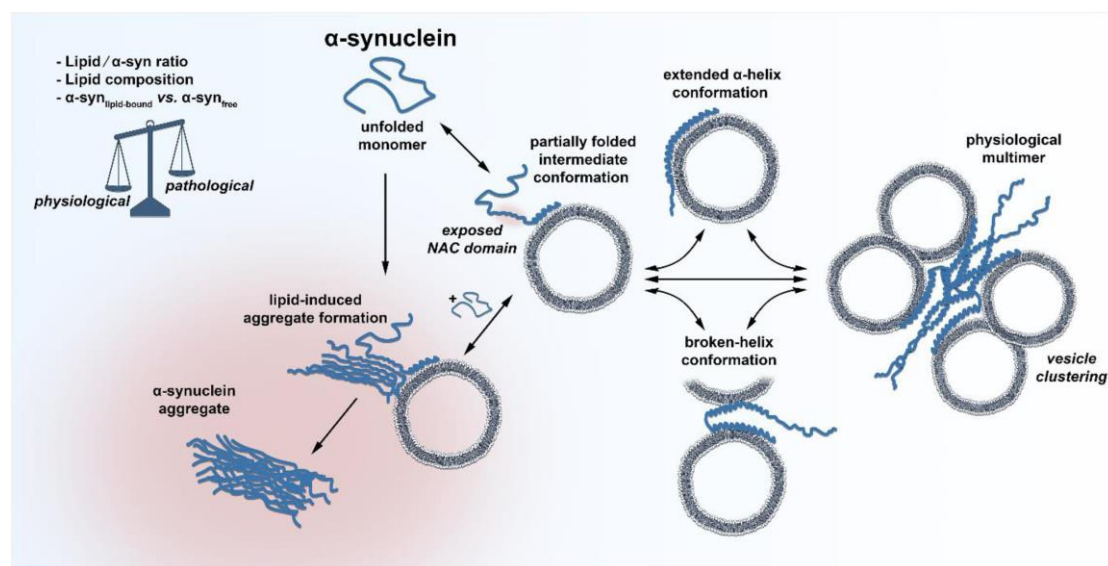


图 1-7 膜相互作用以及脂质/ α -Syn 比值对 α -Syn 的影响示意图^[94]

Figure 1-7 Schematic diagram of the membrane interaction and the effect of lipid/ α -Syn ratio on α -Syn^[94]

不得不提的是, Galvannion 等人认为在静止条件下, 脂质与 α -突触核蛋白的比率是 α -突触核蛋白错误折叠的决定性因素^[95]。在高脂质/ α -突触核蛋白比时, 只有极少量的游离单体 α -突触核蛋白存在, 大量过剩的脂类导致所有的 α -突触核蛋白分子都以 α -螺旋形式结合在膜表面。在这种条件下, α -突触核蛋白的聚集程度很低。然而, 脂质浓度的降低(低脂质/ α -突触核蛋白比率)导致仅有很少的 α -突触核蛋白结合在膜上, 同时相当大比例的 α -突触核蛋白单体自由地存在于溶液中。这一条件对于 α -突触核蛋白在脂质表面纤维化的初级成核步骤十分有利。进一步发现, 只有一小部分囊泡结合的 α -突触核蛋白能够作为活性成核种子完成纤维化过程。

在 α -突触核蛋白与膜结合或在形成 α -螺旋结构的过程中, 可能会出现一种容易聚集的中间构象, 如果这种中间构象存在的话, 自由展开的单体 α -突触核蛋白可以结合并导致异常聚集的发生。由于自然展开的蛋白质本身具有异质构象状态, 并且 α -突触核蛋白的自由能面是存在多个势阱的, 因此这种中间构象的存在是十分有可能的^[96]。事实上, 早在许多年前就有人提出存在部分折叠的 α -突触核蛋白中间构象^[97]。而且发现 pH 的降低或温度的升高都会导致 α -突触核蛋白部分折叠的中间构象的出现。因此, 脂类的浓度可能代表了一个额外的细胞内因子, 它改变了 α -突触核蛋白在易于聚集的中间构象和其天然折叠/未折叠状态之间的平衡。未来的冷冻电子显微镜实验可以提供对这种状态的洞察, 并提供膜诱导的 α -突触核蛋白折叠的完整过程图像。

脂-水界面对于 α -突触核蛋白的初级成核也至关重要。众所周知, 界面播种在 α -突触核蛋白的聚集中发挥重要作用^[98]。 α -突触核蛋白的初始聚集由低的脂质/ α -突触核蛋白比率以及 α -突触核蛋白在膜结合状态和游离状态的浓度变化决定。脂质/ α -突触核蛋白比率可能会因突触中 α -突触核蛋白水平的升高而降低, 从而增加发生脂质诱导的自发聚集事件的几率。通过遗传位点复制/倍增或相关基因(SNCA)启动子区域变异等方式来提高 α -突触核蛋白的表达水平的实验都表明 α -突触核蛋白浓度与帕金森病发病密切相关^[99-103]。导致脂质/ α -突触核蛋白比率变化的另一个因素可能是衰老, 它仍然是与帕金森病发生和进展相关程度最高的风险因素^[104, 105]。

人类大脑干重的一半以上由脂质组成, 大脑中的异质脂肪成分会随着年龄的增长而显著变化。突触处某些脂质(如神经节苷脂)的浓度会随着年龄的增长而降低^[106, 107]。因此, 大脑中与年龄相关的脂质变化可以降低局部脂质/ α -突触核蛋白比率, 增加初级成核率。值得一提的是, α -突触核蛋白聚集不仅由带有小酸性头基的磷脂触发, 还由含有较大寡糖头基的阴离子脂类(如神经节苷脂)触发^[108]。研究发现, 与健康对照组相比,

男性帕金森病患者所有主要的脑神经节苷脂都显著降低^[109]。初步研究进一步表明，用 GM1 神经节苷脂治疗帕金森病可以作为一种疾病改善疗法，GM1 给药减少了啮齿动物 α -突触核蛋白过度表达模型中 α -突触核蛋白聚集体的大小^[110-112]。然而，目前健康、疾病和衰老过程中不同脑区或不同细胞类型的人脑脂质组学研究还很有限。

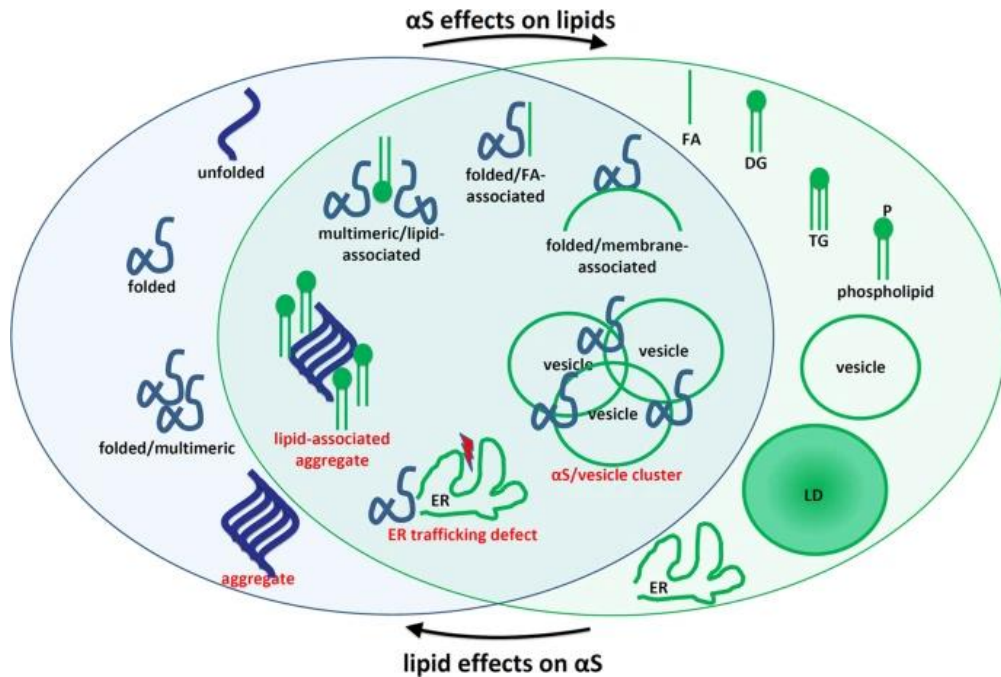


图 1-8 脂质与 α -突触核蛋白相互作用并互相影响^[113]

Figure 1-8 Lipid and α -Synuclein interact and influence each other^[113]

α -突触核蛋白与生物膜的异常相互作用，如膜结合增强，也符合脂质/ α -突触核蛋白比率诱导聚集的概念。研究表明，E46K 突变具有极大的膜亲和力。这种突变破坏了 N 端的 KTKEGV 基序，并极大地破坏了 α -突触核蛋白的生理抗聚集多聚体的稳定性，导致易于聚集的单体 α -突触核蛋白水平增加^[114]。此外，最近的研究显示，由于 E46K 突变， α -突触核蛋白的膜曲率感测能力丧失，从而将 α -突触核蛋白错误导向到非生理性脂质相互作用物上^[115]。通过在其他 KTKEGV 基序中引入两个额外的 E 到 K 突变（E35K 和 E61K，与 E46K 突变一起称为“3K”），这种效应被同等比例地放大，导致 α -突触核蛋白单体构象增加，并诱导神经毒性包涵体。随着单体 α -突触核蛋白的增加，其膜结合行为增加，在脂质表面形成初级成核的几率将大大增加。3K 突变的 α -突触核蛋白小鼠模型的实验印证了这一发现，并且明显地反映了帕金森病的关键特征^[2]。由于膜亲和力的增加和部分折叠中间状态的增加，3K 突变的 α -突触核蛋白在突触前小泡广泛聚集，形成多种不同形态（例如磷酸化和截断）的 α -突触核蛋白沉积。而且 α -突触核蛋白沉积

随着年龄的增长而增加，并演变为具有丝状结构的巨大球形聚集体。而有报道称帕金森病患者大脑中的路易小体主要由碎裂的脂质、囊泡和细胞器组成，这也就与实验所观察到的 α -突触核蛋白沉积所对应，并且显示出明显的脂质相关性^[116]。

膜结合增强、不能形成生理多聚体以及 α -突触核蛋白过表达导致的低脂/ α -突触核蛋白比值可能是 3K 模型显著表型的原因。但家族性 α -突触核蛋白突变 A30P 和 G51D 却不能很好地用这个猜测来解释。事实上，A30P 和 G51D 被发现可以减弱聚集^[57, 117]。此外，与野生型相比，A30P、E46K 和 A53T 的 N 端两亲性 α -螺旋的特定构象的水平升高^[82]。在这种构象中只有一个由 aa3-25 组成的短 α -螺旋是膜结合的，使得疏水的 NAC 区域动态无序，容易形成与疾病相关的聚集体。然而，目前还不能排除 A30P 和 G51D 突变的致病性来自于另一种生理功能丧失机制，而且该机制独立于脂质诱导的聚集。

脂质诱导聚集的理论对 A30P 和 G51D 突变体的不适用也说明了目前对 α -突触核蛋白聚集的研究还存在很大的不足，特别是 α -突触核蛋白折叠的中间构象、膜结合过程、膜结合影响因素以及纤维化和低聚集过程没有准确的微观图景。目前的实验手段在这方面无法提供更多的支持，但分子动力学模拟可以作为实验手段的补充对这些微观过程进行研究。

1.3 α -突触核蛋白的分子动力学模拟研究

1.3.1 分子动力学模拟简介

分子动力学模拟（MD）是依赖计算机计算微观和介观尺度粒子动力学行为的一种模拟技术。随着计算机技术的发展，MD 已经从模拟数百个原子发展到具有生物相关性的系统。模拟系统可以建立在不同的细节层次上，原子层次的建模与真实系统最为接近，当需要大型系统或长时间模拟时，粗粒度表示变得非常适用^[118]。MD 的优势是能够可视化体系中分子（原子）的结构状态，并且追踪其演变轨迹，以此提供实验所不能获得的微观信息。目前 MD 已经在生物方面被广泛应用，模拟时间和体系大小能够接近真实生物学体系。MD 为生物学相关过程的研究提供了新的手段^[118]，在蛋白质构象、生物膜性质研究等方面的应用弥补了实验手段的不足，有效降低了研究成本。

1.3.2 分子动力学模拟在 α -突触核蛋白研究中的应用

目前，分子动力学模拟在 α -突触核蛋白的膜相互作用的研究中已经被广泛应用。主要用于探究膜结合分子机制、膜组分对 α -突触核蛋白膜结合的影响以及膜结合后 α -突触

核蛋白构象的改变等。早在 2007 年 Tsigelny 等人通过分子动力学模拟研究了 α -突触核蛋白转化为寡聚体的动态过程以及如何与 β -突触核蛋白等反聚集伴侣发生相互作用的信息^[119]。2008 年 Mihajlovic 等人利用分子动力学模拟和隐式膜模型探究了 α -突触核蛋白在脂质双层上的结构，他们提出 α -突触核蛋白的疏水残基朝向膜，负电荷残基朝向溶剂，赖氨酸在极性/非极性界面上。并且截短的 α -突触核蛋白与中性膜的结合较弱。它更喜欢阴离子膜，但它也通过其末端与中性膜边缘结合^[120]。紧接着越来越多人利用分子动力学模拟对 α -突触核蛋白的膜结合、膜曲率感应、构象演变以及聚集等诸多问题进行了研究，并且获得了一系列有价值的结果。

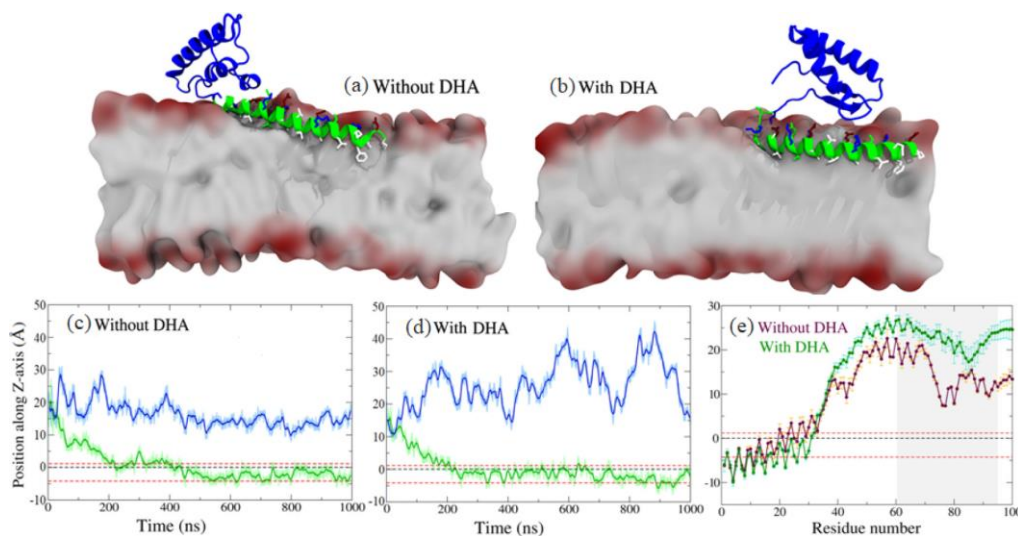


图 1-9 分子动力学模拟被用于研究 α -突触核蛋白的膜结合^[121]

Figure 1-9 Molecular dynamics simulation is used for research membrane binding of α -Synuclein^[121]

通过分子动力学模拟研究 α -突触核蛋白 N 末端的前 15 个残基的膜结合过程获得了 α -突触核蛋白更准确的膜结合自由能图景。不同膜结合状态的 α -突触核蛋白与游离态 α -突触核蛋白相互作用也通过模拟进行了微观机制的研究。通过模拟研究 α -突触核蛋白的膜曲率感应确定了 α -突触核蛋白会被膜表面的脂质堆积缺陷吸引并且嵌入到脂质膜中，并且确定了膜曲率与脂质堆积缺陷的相关性。目前，混合分辨率的分子动力学模拟方法也被应用到 α -突触核蛋白的膜结合以及构象研究中，这也就意味着可以进行更大时间空间尺度的模拟。通过更接近真实生物学相关时空尺度的模拟，我们将更容易将实验与模拟相结合，更准确的反应实验现象并解释微观机制。目前对于不同组分脂质膜对 α -突触核蛋白膜结合影响的研究还很缺乏，同时，因为通过分子动力学模拟建模我们可以获得

任意组分的脂质膜，所以，获得多种不同组分的脂质膜并研究其对 α -突触核蛋白的膜结合的影响是分子动力学模拟的优势之一。

通过分子动力学模拟可以很方便的研究多种不同膜组分的条件下 α -突触核蛋白的膜结合情况。目前多种特殊的膜组分（包括多不饱和脂，甲基支化脂等脂质）对 α -突触核蛋白膜结合的影响已经进行了研究。对于 α -突触核蛋白的膜结合状态已经形成了共识，即是通过 α -螺旋嵌入到脂质膜中。多不饱和脂质能够通过弯曲酰链更好的适应 α -突触核蛋白膜结合造成的膜形变，并且聚集在 α -突触核蛋白周围。甲基支化脂质能够通过增加膜表面的浅缺陷促进 α -突触核蛋白的膜结合。在研究不同组分脂质膜对膜结合的影响的过程中脂质堆积缺陷作为膜表面的非极性区域被大量研究所涉及，而且由于 α -突触核蛋白本身对曲率的识别作用，膜表面堆积缺陷的影响显得更加突出，尤其是浅缺陷的影响。而分子动力学模拟作为一种分子层面的可视化技术，可以很好的计算以及可视化脂质堆积缺陷，这更加增加了分子动力学模拟在 α -突触核蛋白膜相互作用研究方面的应用。通过分子动力学模拟研究不同组分的脂质膜对 α -突触核蛋白膜结合的影响，通过对比确定不同的相互作用因素的作用强弱，通过结构分析判断 α -突触核蛋白的淀粉样蛋白形成倾向。这些研究将为理解 α -突触核蛋白的病理转变机制提供更多信息。

1.4 本论文选题目的及意义

目前实验上对于 α -突触核蛋白与脂质膜之间的相互作用的研究有很多，在膜组分对于 α -突触核蛋白膜亲和力的影响、脂质/ α -突触核蛋白比率对于 α -突触核蛋白病理性转变的影响、 α -突触核蛋白的膜结合对于脂质膜的膜重塑（膜曲率改变等）以及 α -突触核蛋白聚集体的细胞毒性都有非常多的研究。但是这些研究都存在一个共同的问题，就是这些过程的分子机制都还不清楚。实验观测的结果对于 α -突触核蛋白与脂质膜间的作用有了宏观的认识，但是具体的微观过程还存在很大的疑问。而分子动力学模拟为解决这些问题提供了一个有效的方式。

分子动力学模拟在 α -突触核蛋白的膜相互作用研究方面已经有了广泛的应用并发现了一系列有趣的现象。在膜组分对 α -突触核蛋白的膜相互作用的影响方面，目前已经对磷脂头基（电荷，头基大小）以及磷脂尾链的不饱和度方面有了相关的研究。但是在磷脂尾链长度方面的研究还比较少。胆固醇作为调节膜流动性的一个重要的物质，对于脂质膜性质的影响是不可忽略的。而且随着年龄的增加，人脑中短酰链的脂质以及胆固醇含量都会增加，而帕金森病的发病率也会随年龄增加而逐渐上升。这也提示我们短酰

链脂质以及胆固醇在帕金森病，也就是 α -突触核蛋白膜相互作用作用中的重要作用。而目前这两方面已经有人使用实验手段进行了研究，而且确定了短酰链脂质以及胆固醇在 α -突触核蛋白病理转变中的重要作用。但是，其中的分子机制还不不清楚，还需要进行分子层面的更多研究。此外， α -突触核蛋白被证明会以膜结合四聚体的形式稳定存在，但是，具体的低聚物形成过程，也就是膜结合 α -突触核蛋白之间的相互作用模式还存在很多疑问。在对 α -突触核蛋白的膜相互作用有一定认识的基础上探索全长 α -突触核蛋白的膜结合及其低聚物形成过程也是十分必要的。

我们选题的目的即是通过分子动力学模拟来确定短酰链脂质以及胆固醇在 α -突触核蛋白膜相互作用过程中产生的影响及其分子机制，探索 α -突触核蛋白低聚物形成的微观过程及作用机理。通过分析膜结合过程确定膜结合的具体影响因素，通过对不同膜组分的膜性质分析确定产生影响的分子机理，对两种组分对 α -突触核蛋白膜结合的影响的微观机理进行解释。通过对全长 α -突触核蛋白膜结合的分析确定膜结合与其构象转变之间的关系，揭示膜结合 α -突触核蛋白之间相互作用的分子机制。这可以为 α -突触核蛋白的膜结合提供更多的微观信息，对其病理性转变提供基础的研究结果，为开发帕金森病的药物提供更多的支持。

第 2 章 研究方法 with 方案

2.1 全原子分子动力学模拟

分子动力学模拟（MD）是一种依靠计算机来模拟原子（分子）层面体系运动的多体模拟方法。将已知的理论与高性能计算相结合，直接通过计算获得微观的分子运动数据并可视化。全原子分子动力学模拟以原子作为基本粒子进行建模，系统的初始模型是从实验结构或量子力学层次的计算数据中获得的。一般原子（分子）的演化轨迹是从牛顿运动方程的数值求解获得。原子（分子）间的相互作用使用被称“力场”的势函数来描述，通过计算获得体系中粒子的坐标、速度等微观量，并且能够通过统计反映体系的宏观状态。MD 技术可以通过构建合理的模型，模拟实验过程，得到实验不可观测的大量信息，能够有效降低研究成本。目前，MD 技术距离完全取代实验还有很大的距离，主要还是受限于计算机性能。但其优点也同样不可忽视，应用 MD 技术已经为许多实验提供了微观机制的解释，验证了一些理论假说，深入了对物质微观结构的探索，对性能与结构之间的关系提出了更准确的信息。MD 模拟目前已经在化学、生物、物理体系的各种理论研究中被广泛应用。

2.2 研究方案

2.2.1 模型构建

由于 α -突触核蛋白通过其 N-末端（NTD 结构域）与脂膜结合，我们使用 α -突触核蛋白（PDB: 1XQ8）N-末端的前 60 个残基（ α -Syn₆₀）来研究 α -突触核蛋白的膜结合。相比于使用全长的 α -突触核蛋白，这样可以减小计算模型的尺寸，增加模拟的时间尺度以使得模拟更接近真实的情况。模拟使用了多种磷脂来构建脂质膜以更接近真实的膜组分。脂质膜中磷脂头基选用最常见的磷酸胆碱（PC）构建基本的膜骨架，加入磷酸丝氨酸（PS）作为膜内负电荷的来源，构建出基本的负电脂质膜。另外加入细胞中含量丰富的磷酸乙醇胺（PE）构建更加接近真实生物膜组分的模型膜（囊泡中含量最多的磷脂及其比例为 PC: PE: PS = 4: 3: 1）。磷脂尾链选用最常见的油酰基（C18:1）作为尾链的主要成分，这样可以保证模型膜在人体温度下（37℃）不会发生相变（转变到凝胶态），能够保持稳定的流体状态。加入神经元细胞膜中含量丰富的二十二碳六烯酸（DHA，C 22:6）来更好地模拟真实的体内环境，并且可以增加模型膜的流动性。我们采用了 2C1

6:0 磷酸胆碱 (DPPC), 2C16:0 磷酸乙醇胺 (DPPE), 2C16:0 磷酸丝氨酸 (DPPS), 2C18:1 磷酸胆碱 (DOPC), 2C18:1 磷酸乙醇胺 (DOPE), 2C18:1 磷酸丝氨酸 (DOPS), 2C10:0 磷酸胆碱 (DDPC), 2C18:0 磷酸胆碱 (DSPC), 2C22:6 磷酸胆碱 (DDoPC), 2C22:6 磷酸乙醇胺 (DDoPE), 2C22:6 磷酸丝氨酸 (DDoPS) 以及胆固醇来构建磷脂双层膜。

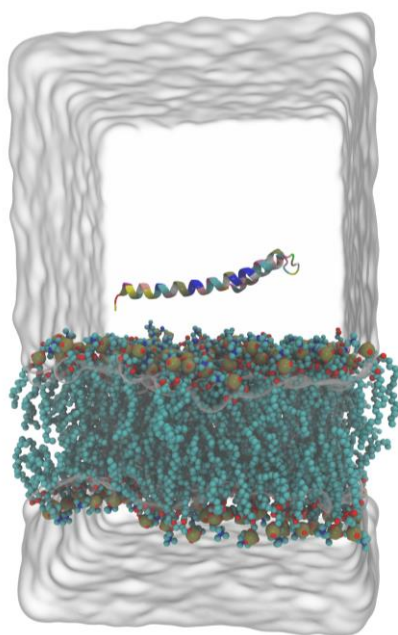


图 2-1 初始模型图

Figure 2-1 Initial model diagram

在初始模型中, α -Syn₆₀ 被放置在脂质双层附近, 并加入钠离子来中和体系中的净电荷。因为钠离子比较小并且带电量为 1, 所以对于体系中两者之间的相互作用影响较小。脂质膜建模完成后先经过长时间的预平衡使其完全弛豫, 然后再与 α -突触核蛋白组装成最终模型。在研究酰链长度对 α -Syn₆₀ 膜结合的影响时, 采用 DOPC: DDoPC: DOPS: DDPC/DSPC = 13%: 25%: 12%: 50% 的比例构建包含不同长度酰链的脂质膜; 在研究胆固醇的模型中, 采用 DOPC: DOPE: DOPS = 4: 3: 1 的比例构建脂质膜, 额外加入 30% 的胆固醇形成包含胆固醇的对照组。两组模型中除胆固醇外均为上下小叶各包含 128 个脂质分子的双层膜。

在最后一部分的研究中, 采用全长的 α -突触核蛋白以及更大的脂质膜构建模型以研究全长 α -突触核蛋白的膜结合以及膜结合后的聚集。 α -突触核蛋白采用空间体积相对较小的模型 (PDB: 2KKW); 脂质膜采用 DPPC: DPPE: DPPS: DOPC: DOPE: DOPS: DDoPC: DDoPE: DDoPS = 4: 3: 1: 4: 3: 1: 4: 3: 1 的比例构建上下两小叶分别包

含 192 个脂质的磷脂双分子层。聚集过程的研究是通过扩展 α -突触核蛋白单体膜结合的模型来形成包含四个膜结合 α -突触核蛋白的体系。通过牵引使得 α -突触核蛋白靠近，然后利用无偏分子动力学模拟进行长时间的采样。

2.2.2 模拟参数设置

所有模拟均使用 GROMACS-2019.6 软件进行。模拟中生物分子以及离子均采用 Charmm36m 力场，溶剂使用 TIP3P 水模型。用 LeapFrog 算法对运动方程进行积分，时间步长为 2 ps。使用 N $\acute{o}$ Se-Hoover 恒温器(310K, $\tau_T=1$ ps)和半各向同性 Parrinello-Rahman 方法(1bar, $\tau_P=5$ ps)进行压力耦合。用 Verlet 方式更新邻居列表，范德华相互作用的截止距离设置为 1.2 nm。静电相互作用的计算采用光滑粒子网格 Ewald (PME) 方案，真实空间截止值为 1.2 nm。最近邻列表每 20 步更新一次。Lincs 算法被用来约束键长。原子坐标每 100 ps 写出一次。用 PackMem 软件分析脂质膜的脂质堆积缺陷，并用 VMD 进行可视化。

2.2.3 研究思路

α -突触核蛋白的膜结合与其正常的功能以及病理性转变密不可分。目前 α -突触核蛋白的膜结合以及低聚物形成的微观机理还不清楚，不同性质脂质膜对 α -突触核蛋白膜结合的影响也还不明了。所以我们采用分子动力学模拟来对 α -突触核蛋白的膜相互作用进行研究，研究了酰链长度以及胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合的影响，然后进一步研究了全长 α -突触核蛋白的膜相互作用以及聚集过程。以期为 α -突触核蛋白的膜结合甚至是其病理转变提供更多的微观信息。

在研究磷脂尾链长度对 α -突触核蛋白膜结合影响的对照组中加入两种不同长度的饱和脂肪酸尾链的磷脂，分别是十个碳原子长度(C10:0)和十八个碳原子长度(C18:0)的两种尾链的磷脂，添加量为 50%，以得到更加明显的对比效果。在胆固醇的对照组中，其中一组不加入胆固醇，另一组加入正常人体含量的 30%的胆固醇来实现对照。在研究全长 α -突触核蛋白的膜结合以及聚集模型中，采用三种不同的头基以及三种不同尾链的组合来构建模型，以研究 α -突触核蛋白膜结合对脂质膜中脂质分布的影响。

在酰链长度以及胆固醇影响的研究中，只使用 α -突触核蛋白的膜结合部分来构建最终模型，是为了减小模型的空间尺度以获得更长时间的采样，获得更多 α -突触核蛋白与脂质膜相互作用的信息。并且目前的模拟研究表明 α -突触核蛋白的膜结合部分长度并没有超过 30 个氨基酸，所以截取 N 末端前 60 个残基来研究 α -突触核蛋白的膜结合是足

够的。在膜结合研究的基础上，再使用更大的体系以及全长的 α -突触核蛋白来对发现的某些现象进行更深入的研究，获得更有说服力的结果。 α -突触核蛋白是一种内禀无序蛋白，研究其过渡态结构与功能之间的关系也十分必要。所以在上述工作中我们也对 α -突触核蛋白的结构以及稳定性进行了分析。

根据以上分析，我们的研究分为两步：首先研究了 α -突触核蛋白的膜结合过程以及脂质膜成分对 α -突触核蛋白膜结合的影响；然后在此基础上研究全长 α -突触核蛋白的膜结合以及膜结合后的聚集过程。

第3章 酰链缩短对 α -突触核蛋白膜相互作用的影响

3.1 模型构建

为了构建包含不同酰链长度的磷脂膜，我们选择 2C10:0 磷酸胆碱和 2C18:0 磷酸胆碱作为两种磷脂膜中的对照参量，为了使对比更加明显，在磷脂膜中参与对照的这两种磷脂占比 50%。另外加入常见的 2C18:1 磷酸胆碱(DOPC)，2C18:1 磷酸丝氨酸(DOPS)以及 2C22:6 磷酸胆碱(DDoPC)，含量分别为 13%，12%和 25%。依照此比例我们构建了两种不同酰链长度的磷脂膜。两种磷脂膜中参与对照的脂质为饱和磷脂，其他的磷脂为不饱和磷脂，选择不饱和磷脂主要是为了保持磷脂膜的流动性，维持流体状态。在我们前期的测试中，全部使用饱和磷脂的模型，特别是酰链较长的磷脂膜，在正常人体温度下（37 °C）会发生相变，转变为流动性很差的凝胶态。在凝胶状态下 α -突触核蛋白很难发生膜结合，在有限的时间内难以获得有价值的结果。

为了在有限的计算资源和保证模型合理性的前提下延长模拟时间，此模型中选择了截短的 α -突触核蛋白，以膜结合区域（N 末端前 60 个氨基酸）为代表，与两种不同的磷脂膜构建了最终的体系模型。这种截短的蛋白质模型已经被广泛应用在膜结合的研究中，模拟结果与全长的蛋白质差异不大。另外在溶剂中加入了钠离子以实现体系的电中性。初始构型如图 2-1 所示。

3.2 酰链缩短对 α -突触核蛋白膜亲和力的影响

根据前人的研究结果，随着生物体的衰老，生物膜上具有更短酰链的磷脂的含量将会增加，并且这种短酰链磷脂的增加将会降低 α -突触核蛋白对突触小泡的亲和力。在这里，我们对 α -Syn₆₀ 在包含短酰链磷脂的生物膜体系和包含长酰链磷脂的生物膜体系中的膜结合过程进行了研究，以找出影响 α -突触核蛋白膜结合的多方面因素。在 500 ns 的模拟过程中， α -Syn₆₀ 从膜表面附近的位置开始朝向膜方向或背离膜方向移动。对于包含不同长度酰链的两个体系，我们分别进行了五次独立的重复模拟。从体系的最终构象（图 3-1 a 和 b）可以发现，在短酰链磷脂体系的五次模拟中，有两次出现了 α -Syn₆₀ 嵌入脂质膜中的情况，而在长酰链磷脂体系的五次模拟中都没有发生这种情况。也就是说， α -Syn₆₀ 有 40%的几率与含有短酰链磷脂的脂质膜产生强结合（嵌入脂质膜中），但很难与含有长酰链磷脂的脂质膜产生强结合。

为了确认我们观察到的这一现象，我们需要对膜结合有一个更加清晰地认知，并且有定量的判断标准。所以在这里，我们首先深入分析了膜结合模型（短酰链系统第三次模拟）和非膜结合模型（短酰链系统第二次模拟），希望对膜结合过程有进一步的了解。为了定量膜结合事件，我们定义“膜结合”状态为：如果 α -Syn₆₀ 的 N 末端的前 8 个氨基酸（ α -Syn₈）的质心穿过膜表面（图 3-1(c)中上方的黑线）并保持一段时间。对两个体系的五次独立模拟分别进行质心位置分析，我们得到了与最终构象中观察到的同样的结果。但由于模拟次数不够，不能排除偶然性的影响。为此，我们通过增强采样计算了膜结合部分（ α -Syn₈）接近并嵌入两种脂质膜过程中的自由能变化，以此来确认 α -Syn₆₀ 与两种不同长度酰链脂质膜结合的难易程度。

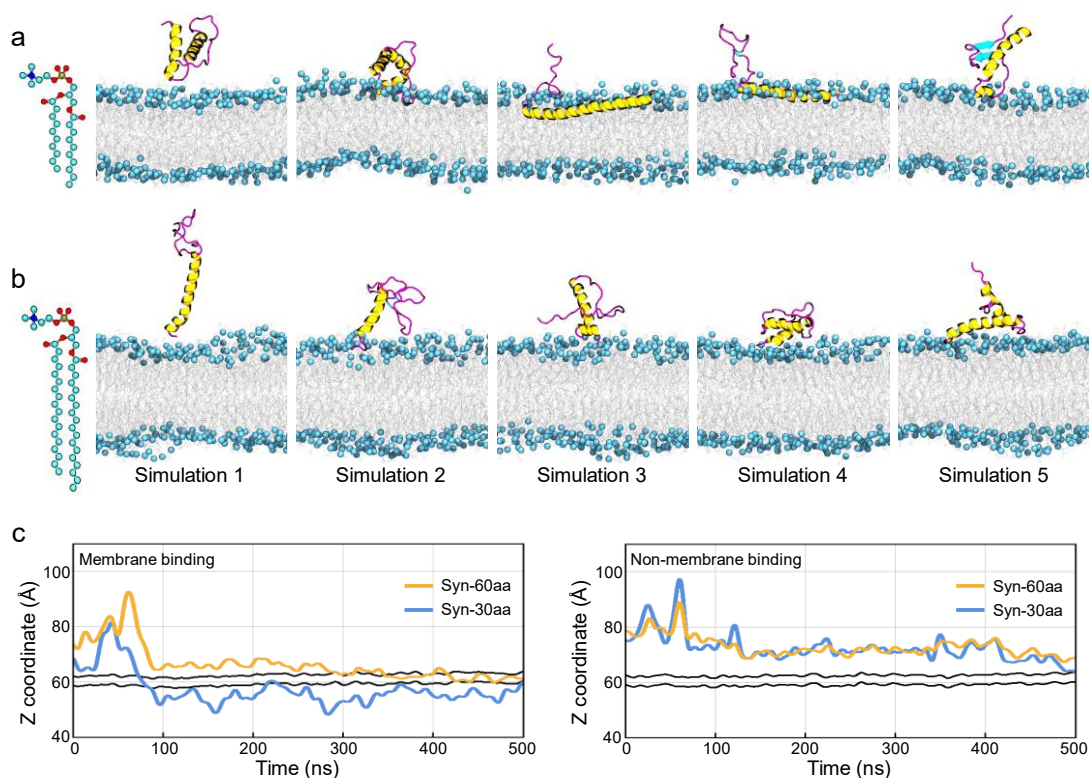


图 3-1 (ab) 两个体系所有模拟的最终构象（500 ns 处）， α -Syn₆₀ 以二级结构显示， α -helix 显示为黄色， β -sheet 显示为青色，无序线团显示为玫色，磷原子以蓝色球显示，磷脂尾链以灰色线显示；(c) 膜结合与未膜结合体系中 α -Syn₆₀ 中各部分质心与磷脂膜相对位置示意图，其中上方的黑色线表示磷脂膜最外侧原子平面，下方的黑色线表示磷原子平面

Figure 3-1 (a and b) The final conformations after 500 ns simulations; α -Syn₆₀ is showed in the form of secondary structure, the α -helix is displayed in yellow, the β -sheet is displayed in cyan, and the disordered coil is displayed in rose; Phosphorus atoms in lipids are shown in blue spheres, and phospholipid tails are shown in gray lines; (c) Temporal evolution of the z position of the first 8 (blue lines) and 60 (orange lines) residues of α -Syn₆₀ and the membrane; The black lines below indicate the phosphorus atom plane in the lipid membrane, the black lines above indicate the membrane surface

在没有足够的独立重复模拟的情况下，为了使计算的结果更具有说服力，本文计算了 α -Syn₈（膜结合部分）从游离状态到嵌入磷脂膜状态的过程中的自由能变化。从自由能曲线（图 3-2）可以看出，当 α -Syn₈ 从远处接近含有不同长度酰链的脂质膜表面时，其自由能有显著的下降（图 3-2 中约 1 nm 处），这表明相对于游离在溶液中， α -Syn₈ 更倾向于吸附在膜表面。我们认为此过程的驱动力主要在于磷脂膜中带负电荷的磷脂（本体系中是磷脂酰丝氨酸）对 α -Syn₈ 中带正电荷的氨基酸的吸引。此外，由于截短的 α -Syn₈ 中的阳性残基数量很少，潜在的势阱深度可能与 α -Syn₆₀ 有很大的不同。我们推断，对于全长 α -Syn，从足够远处到接近脂质膜表面的自由能下降幅度将更大。此外，由于含有长酰链的膜在此处具有较大的负电势（图 3-3），因此此处的势阱深度将大于含有短酰链的脂质膜，不过由于模型的尺度限制，这个现象并没有明显出现。本文将在 3.5 部分详细讨论这一点。

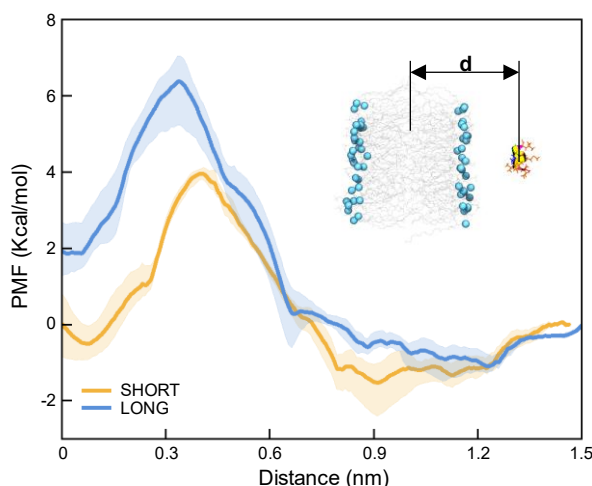


图 3-2 α -Syn₈ 与磷脂膜结合过程的平均力势图
Figure 3-2 PMF for pulling α -Syn₈ close to the membrane

当 α -Syn₈ 继续向磷脂膜方向靠近时，两者距离最近的部分原子出现接触，即 α -Syn₈ 中的原子开始进入脂质膜表面以下的区域， α -Syn₈ 中的原子与磷脂膜中的原子出现较大的斥力。此时，一个相对较大的势垒阻止了 α -Syn₈ 进一步嵌入到脂质膜中。虽然势垒的高度并不大，但是这一势垒的最大值在酰链长度不同的两种磷脂膜中是不同的。在长酰链的磷脂膜中这一势垒更大，这意味着 α -Syn₈ 需要更多的能量才能克服这一阻碍并嵌入到长酰链的磷脂膜中。而在短酰链的磷脂膜中这一势垒更小， α -Syn₈ 更容易嵌入到短酰链的磷脂膜中。这种结果与我们在多次无偏模拟中观察到的现象相一致，即 α -Syn 更容易嵌入到（强结合）短酰链的磷脂膜中。

从自由能曲线中还可以发现,在两种磷脂膜中,磷原子层附近的自由能势阱深度差异不大。也就是说, α -Syn 与酰链长度不同的磷脂膜结合的强度大致相同。由此我们可以推断,当 α -Syn 与不同酰链长度的磷脂膜结合后,再发生分离的概率大致相同。这样,由于 α -Syn 具有更大的进入短酰链的磷脂膜的几率,所以在较长的时间范围内应该有更多的 α -Syn 与短酰链的磷脂膜结合,但这与实验观察到的结果正好相反。同时,这也提醒我们去考虑我们所认为的“膜结合”与实验中所说的“ α -Syn 与脂质膜的亲和力”之间的关系。

3.3 α -突触核蛋白膜结合过程的微观机制

为了解释本文的结果与实验结果之间的差异,有必要对膜结合过程的分子机制有一个更加深入的了解。首先,为了了解膜结合的驱动力,我们跟踪了结合过程中的相互作用能变化(图 3-3(a))。从相互作用能曲线可以看出,在最初阶段,当 α -Syn₆₀ 远离脂膜时,库仑相互作用起主导作用。与没有发生膜结合的模型相比,如果发生强结合(嵌入), α -Syn₆₀ 与磷脂膜的相互作用能中范德华相互作用能所占的比例将显著增加。在没有膜结合的情况下,范德华相互作用能的增加与膜结合相比并不明显,始终保持一个较低的值。因此,初始 α -Syn₆₀ 接近脂质膜的驱动力为静电相互作用,发生嵌入的过程中是静电以及疏水相互作用共同作用的结果。我们可以推测,在发生膜结合的模型中,带正电的氨基酸和带负电的磷脂头基之间的长程库仑相互作用会先使得 α -Syn₆₀ 首先接近膜,然后磷脂膜的疏水部分与 α -Syn₆₀ 的疏水残基相互作用,驱动 α -Syn₆₀ 与磷脂膜发生更强的结合。

在膜表面,除了亲水的头部基团外,还有一部分疏水的尾链会暴露在溶液中,这被称为“脂质堆积缺陷”。根据相互作用能的变化可以推断,在发生较强的膜结合的过程中除负电荷外,脂质堆积缺陷应该是一个非常重要的方面。

从膜结合模型的最终构象可以发现, α -Syn₆₀ 的一部分已经嵌入到磷脂膜的磷原子平面下。在发生膜结合模型中, α -Syn₆₀ 首先在负电荷的吸引下接近膜表面,然后间歇性地在磷脂膜表面吸附和解吸。一旦与双层强烈结合, α -Syn₆₀ 的 N 末端区域会以 α -螺旋的形式插入到膜表面下方。如果没有发生强结合, α -Syn₆₀ 总是会以不同的区域(氨基酸序列)间歇地与磷脂膜接触。对于这种间歇性的接触过程,极有可能是 α -Syn₆₀ 对于不同的磷脂膜表面区域有不同的相互作用方式。根据现有的证据我们可以推测,当 α -Syn₆₀ 与磷脂头基接触时将会发生吸引但是不能维持长时间的接触;而当 α -Syn₆₀ 与磷脂膜表

面的脂质堆积缺陷接触时，由于非极性残基与磷脂烃尾的疏水相互作用， α -Syn₆₀ 嵌入到磷脂膜的烃尾区域，即发生膜结合。所以，我们将注意力放在了对膜表面疏水区域，即脂质堆积缺陷的研究中，进而研究了酰链缩短对 α -Syn 膜结合的影响。

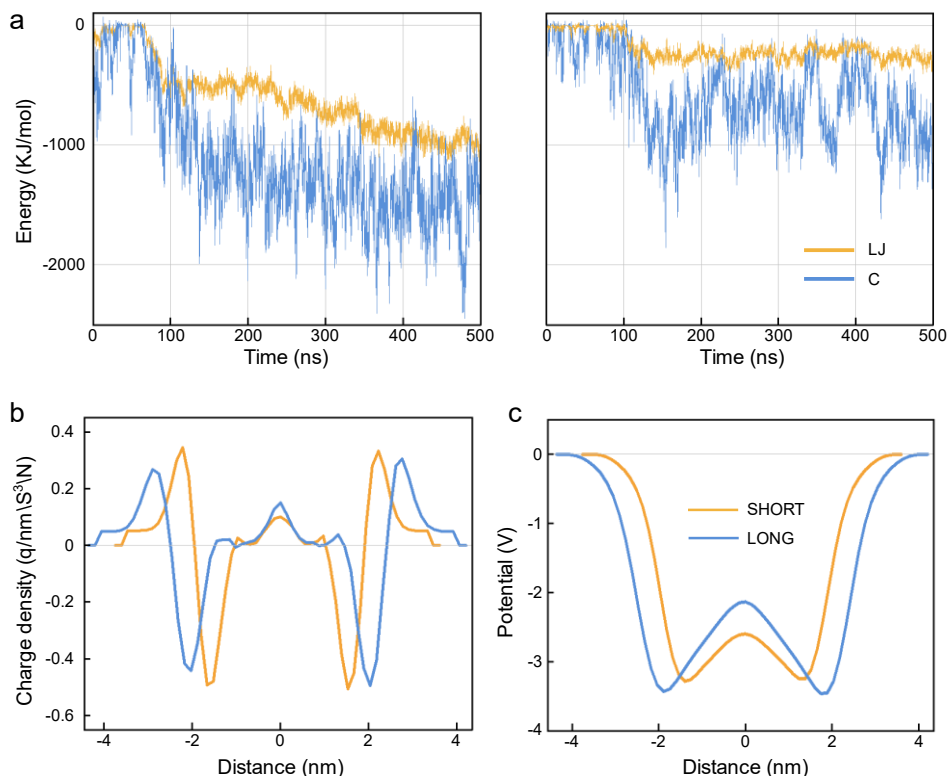


图 3-3 α -Syn 膜相互作用分析；（a）膜结合（左图）与未膜结合（右图）体系的相互作用能演化图，蓝色线表示库伦相互作用，橙色线表示范德华相互作用；磷脂膜中膜法线方向（b）电荷密度分布及（c）电势图

Figure 3-3 Analysis of α -Syn membrane interaction; (a) Temporal evolution of the interaction energy between α -Syn and lipid membrane; The blue lines indicate the coulomb interaction energy, and the orange lines indicate the van der Waals interaction energy; (b) Charge density and (c) electrostatic potential distribution in the direction perpendicular to the surface of lipid membrane

从上面的分析可以看出，疏水相互作用（脂质填充缺陷）在膜结合过程中起着决定性的作用，所以我们从这个角度做了更详细和深入的分析。 α -Syn₆₀ 的膜结合在短酰链磷脂膜的体系发生，而在长酰链磷脂膜的体系中不发生，疏水相互作用在膜结合过程中起重要作用。为了证实这一观点，我们分析了 α -Syn₆₀ 的疏水残基和磷脂膜表面的脂质堆积缺陷，并重点研究了 α -Syn₆₀ 插入磷脂膜的过程（图 3-4(a)）。

一方面，当插入现象发生时（图 3-4(a)，74 ns），即当 α -Syn₆₀ 的 N 末端开始与磷脂膜表面接触， α -Syn₆₀ 的 N 末端接近一个较大的脂质堆积缺陷。在 α -Syn₆₀ 的 N 端逐渐嵌入脂质膜的过程中， α -Syn₆₀ 周围的脂质堆积缺陷面积逐渐增大。当 α -Syn₆₀ 完全嵌入

到脂质膜中时， α -Syn₆₀ 周围的脂质堆积缺陷面积趋于稳定。对 α -Syn₆₀ 的 N 末端周围的脂质堆积缺陷的定量分析（图 3-4(c)）也证实了这一现象。根据这些分析可以证明，在 α -Syn₆₀ 与磷脂膜频繁接触的过程中，如果接触部位有较大的脂质堆积缺陷区域， α -Syn₆₀ 很可能会继续嵌入到磷脂膜内，并且导致附近脂质堆积缺陷的增加。

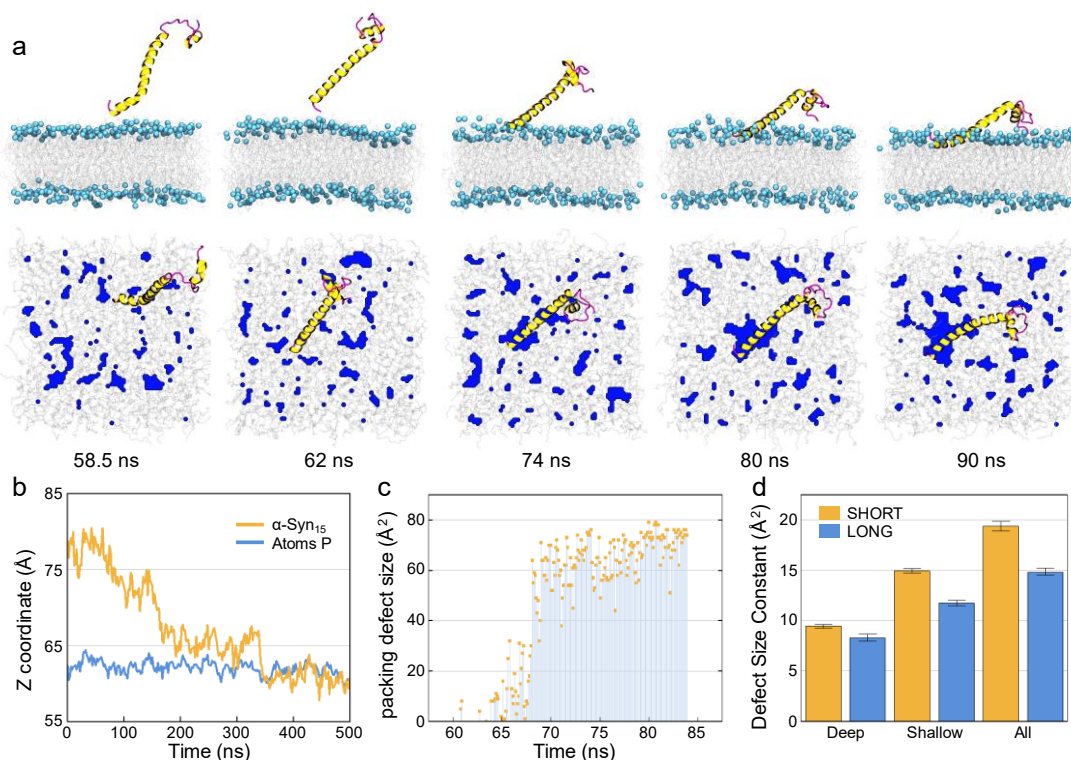


图 3-4 (a) 膜结合过程示意图，上下两组分别为膜结合过程中两者的相对位置主视图和俯视图，下图中蓝色部分为脂质堆积缺陷；(b) 膜结合过程 α -Syn 膜结合部分（前 15 个残基）质心位置图；(c) 膜结合过程中 α -Syn 周围脂质堆积缺陷面积；(d) 两种磷脂膜中脂质堆积缺陷常数对比图

Figure 3-4 (a) Schematic diagram of membrane binding process of α -Syn; Front view and top view of the relative position of α -Syn₆₀ and lipid membrane during membrane binding; The blue part in the top view is the lipid packing defect; (b) Temporal evolution of the z position of the first 15 (orange lines) residues of α -Syn₆₀ and the membrane during membrane binding; (c) Temporal evolution of the size of lipid packing defect around α -Syn during membrane binding; (d) Defect size constant of the two lipid membranes

另一方面， α -Syn₆₀ 嵌入到磷脂膜内的区域在插入前后都保持了两亲性螺旋状态（图 3-4(a)）。通过分析 α -Syn₆₀ 的 N 末端前 15 个残基（ α -Syn₁₅）的相对位置，可以发现插入之前，两亲性螺旋的亲水表面面向磷脂膜方向。插入后，亲水表面发生翻转面向溶液（图 3-5），相应的，两亲性螺旋的疏水表面面向磷脂膜方向。也就可以说，在插入之前， α -Syn₆₀ 中的正电残基被膜中的负电荷吸引并面向膜表面，因此 α -Syn₆₀ 逐渐接近膜表面。在插入过程中，膜表面的脂质堆积缺陷与 α -Syn₆₀ 中的疏水残基相互作用，导

致 α -Syn₆₀ 的两亲性螺旋翻转，从而促进 α -Syn₆₀ 进一步嵌入到膜中。这与我们的推测相一致，并且这一现象解释了 α -Syn₆₀ 的插入发生在脂质堆积缺陷处，以及插入过程中范德华相互作用能显著增加的原因。

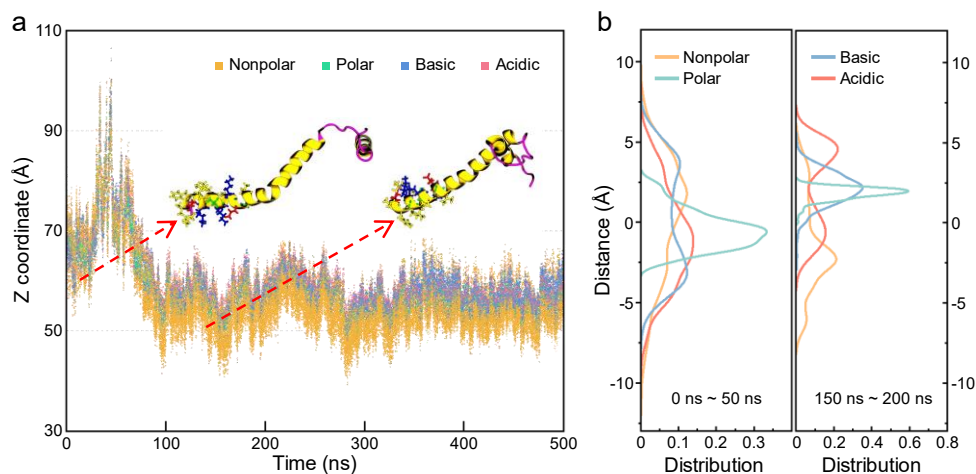


图 3-5 (a) 膜结合过程中 α -Syn₆₀ 膜结合部分（前 15 个残基）的质心位置变化；黄色，绿色，红色和蓝色分别代表非极性，极性，正电和负电残基；(b) 膜结合部分残基的位置统计分布图
Figure 3-5 (a) Temporal evolution of the z position of the the first 15 residues of α -Syn₆₀; Yellow, green, red and blue represent nonpolar, polar, positively charged and negatively charged residues respectively; (b) Distribution of relative positions of residues with different properties over a period of time

综上所述，我们可以将 α -Syn₆₀ 的膜结合过程分为两个阶段：一是 α -Syn₆₀ 的正电残基通过库仑相互作用与磷脂膜中带负电荷的磷脂酰丝氨酸头部基团相互吸引并接近膜表面；二是当 α -Syn₆₀ 接触膜表面的脂质堆积缺陷中的磷脂酰链时，两亲性螺旋的疏水表面发生翻转， α -Syn₆₀ 的疏水残基与脂质堆积缺陷通过疏水相互作用产生强结合。

其中第二阶段仅发生在 α -Syn₆₀ 嵌入脂质膜的模型中，而第一阶段发生在所有的模型中，而且相对于第一阶段，疏水相互作用在第二阶段起到了决定性的作用，所以我们判断两种磷脂膜中脂质堆积缺陷的差异可能是嵌入过程是否发生的决定性因素。因此，我们利用 PackMem 软件对两种磷脂膜中的脂质堆积缺陷进行了定量分析。通过比较两种含有不同长度酰链的磷脂膜的脂质堆积缺陷可以发现，无论是深缺陷还是浅缺陷，短酰链的磷脂膜都多于长酰链的磷脂膜。这个结果与我们发现的 α -Syn₆₀ 更容易嵌入到短酰链的磷脂膜中相对应。综上所述，脂质堆积缺陷的增加会增加 α -Syn₆₀ 与磷脂膜发生强结合的几率，而磷脂膜中磷脂酰链的缩短会增加脂质堆积缺陷的数量。但目前还不清楚酰链缩短是如何导致脂质堆积缺陷增加的，这还需要对磷脂膜烃尾的堆积结构进行进一步的分析。

对于两个体系中未发生强结合模型来说, 酰链长度不同的两种脂质膜与 α -Syn₆₀ 的库仑相互作用值也有不同。通过对两种磷脂膜表面电荷分布和法向电势的分析, 我们发现两种脂质膜表面的电荷密度大致相同, 但含有较长酰链的脂质膜表面有较大的负电势, 而这也会吸引更多的 α -Syn 靠近脂质膜。因此, 对于溶液中的游离 α -Syn, 含长酰基的脂质膜对其具有较强的亲和力。而理解产生这种表面电势差异的原因也还需要对不同酰链长度的磷脂膜进行更多的结构分析。

3.4 酰链缩短对磷脂膜性质的影响

脂质堆积缺陷是指脂类的松散堆积, 导致脂族碳暴露到溶剂中的空腔, 这个空腔或深入或靠近膜表面, 分别称为深缺陷和浅缺陷。磷脂膜中脂类的几何排列显示出缺陷, 主要是因为它们含有大量形状与典型圆柱形不同的脂类。脂类的几何形状取决于酰链的性质和磷脂尾链的分布。脂类堆积对于脂质膜性质的影响也可能相当大, 从而显著影响外周蛋白的结合。由此我们推测, 磷脂酰链的缩短导致脂质堆积出现变化, 进而影响脂质堆积缺陷的产生, 最终影响了 α -Syn₆₀ 的膜结合。

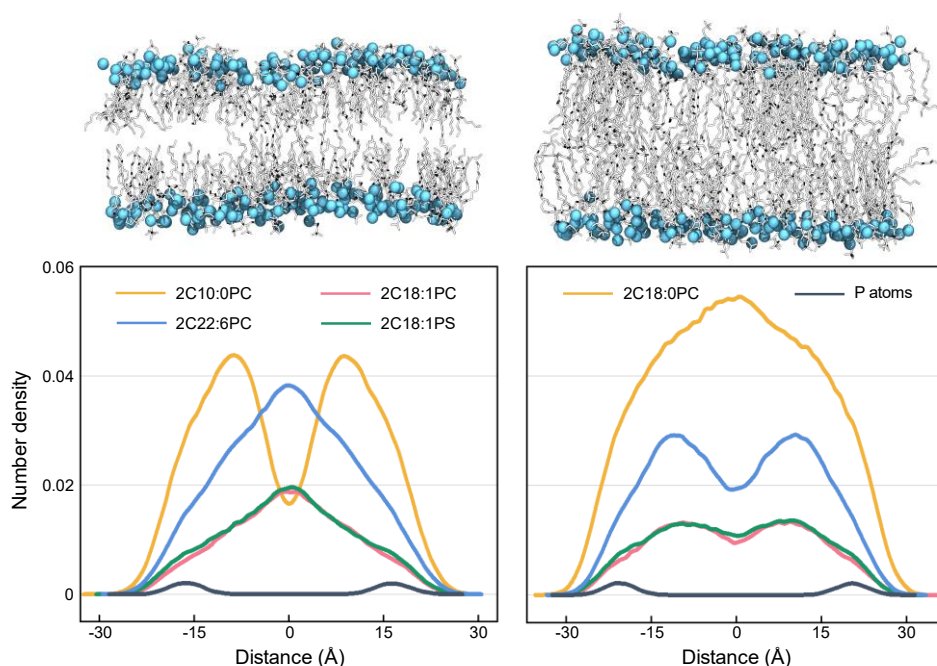


图 3-6 包含不同长度酰链的磷脂膜中磷脂分布示意图(上面两图, 左为短酰链膜, 右为长酰链膜)和各种磷脂在膜法线方向的数密度分布图(下面两图, 左为短酰链膜, 右为长酰链膜)

Figure 3-6 Schematic diagram of the distribution of two lipids containing different lengths acyl chains in the two lipid membranes; The number density distribution of each lipid in the two lipid membranes perpendicular to the membrane surface

为了探索各种磷脂在磷脂膜中的一般堆积状态，我们分析了各种磷脂在磷脂膜法线方向上的数密度分布。如图 3-6 所示，具有不同酰链长度的两种磷脂的分布有非常明显的差异。通过 Z 方向的数密度曲线可以发现，2C10:0 磷酸胆碱很少或几乎不存在于膜的中心，主要分布在靠近膜表面附近。相反，2C18:0 磷酸胆碱在膜中央有一个峰，其尾链集中分布在膜中心位置。此外，其他几种不饱和磷脂在短酰链的磷脂膜中倾向于分布在膜的中央，而在长酰链的膜中倾向于分布在磷脂双层靠近表面的位置。如图 3-6 中的快照所示，当磷脂酰链较长时，这部分长酰链似乎将整个磷脂膜“支撑”起来了，而当酰链变短时，它似乎是失去了对磷脂膜的“支撑”，这也导致磷脂膜显著变薄。由于丧失了支撑作用，酰链变短间接地导致膜的横向拉伸，其表面积增加，磷脂头基的堆积更加松散，也就意味着磷脂膜表面出现脂质堆积缺陷的概率大大增加。

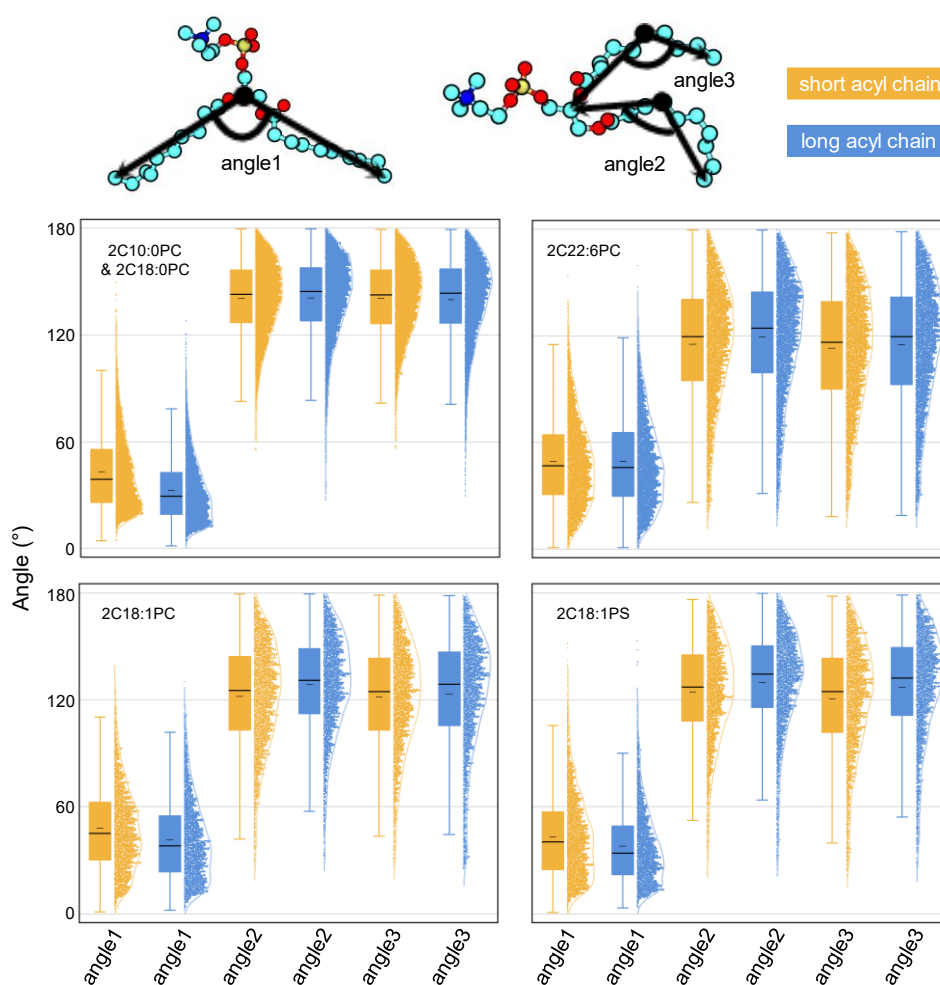


图 3-7 两种磷脂膜中磷脂尾链不同特征角度的统计分布图

Figure 3-7 Statistics of three characteristic angles of phospholipid tail chain in two lipid membranes

为了确定磷脂尾链在磷脂膜中具体的堆积状态,我们计算了每个磷脂酰链的三个角度来表征其分布,结果如图 3-7 所示。我们可以清楚地看到,相比于长酰链的磷脂膜,在短酰链的磷脂膜中,饱和磷脂和单不饱和磷脂的角 1 较大,而角 2 和角 3 较小。而多不饱和磷脂在两种不同长度酰链的磷脂膜中的夹角 1 相差不大,夹角 2 和夹角 3 的变化规律与其他磷脂相同。很明显的,当角度 1 较大时,酰链在横向的堆积范围更广,角度 2 和角度 3 较小时,酰链折叠更大,酰链尾端离磷脂头基更近。因此可以确定,在短酰链磷脂膜中不饱和磷脂的折叠状态导致磷脂酰链更接近脂膜表面,而且更宽的分布导致头基的分布更加松散,也更有利于在膜表面形成脂质堆积缺陷。综上所述,磷脂膜中酰链的缩短会使膜变薄,导致更松散的头部基团分布和更接近膜表面的酰链分布,两者共同决定了含有较短酰基链的磷脂膜具有更大的脂质堆积缺陷。

结合现有的分析,我们再联系自由能势垒出现差异的位置,可以推断,出现势垒高度差异的主要原因应该是磷脂头部基团的堆积结构的不同。头基堆积结构的差异可能源于两方面,包括头部基团类型的不同和分布状态的不同。由于本研究中两组模型的磷脂膜的头部基团组成相同,我们就可以推断,两组磷脂膜头部基团的分布应该有很大的差异。从以上对脂质堆积缺陷的分析中不难发现,在短酰链磷脂膜中,头基堆积较为疏松。因此,当 α -Syn 进入含有短酰基链的脂质膜的头部基团区域时,它受到的阻碍较小,这一过程的自由能垒也相对较低。由于含有较长酰基链的膜上的头基积累得更紧密, α -Syn 进入头基区以及随后的更深嵌入过程的障碍都会增加。这导致在我们的模拟中没有 α -Syn 嵌入到长酰链磷脂膜中。综上所述,可以确定,磷脂头部基团在短链脂膜中的较松散堆积(较大的脂质堆积缺陷)大大降低了插入障碍,使膜结合过程更容易发生。

3.5 酰链缩短引起 α -突触核蛋白聚集

上文的研究结果表明, α -Syn 更容易结合到短酰链的磷脂膜上,而这与实验结果相反。而且经过我们的分析可以发现,在出现膜结合这个事件上,短酰链的磷脂膜确实更有优势。所以我们将目光放在了膜结合之前的状态,也就是 α -Syn 从游离态到与磷脂膜间歇性接触状态的这段时间上。我们将 α -Syn 与磷脂膜的相互作用状态分为三种:1.游离态: α -Syn 不与磷脂膜直接接触;2.接触状态: α -Syn 吸附在磷脂膜表面;3.结合态: α -Syn 嵌入磷脂膜中。我们还对所有模拟中三种状态的持续时间进行了统计(图 3-8(a))。排除两组发生膜结合的模型,对比其他模型中 1, 2 两种状态的持续时间,我们可以发现在长酰链磷脂膜模型中接触状态持续的时间更长,也就是说, α -Syn 在长酰链磷脂膜

表面吸附的时间更长。如果实验中所说的亲和力也包括了接触状态，那么本文的结果就能够与实验结果相对应。所以对于接触状态也应该进行更深入的讨论。

从前面的分析可以看出，这种接触状态主要是由静电相互作用主导的。不同磷脂膜表面的电荷量是相同的，但由于短酰基链的膜具有较大的脂质堆积缺陷和较大的面积，表面电势较低，导致对 α -Syn 中的带正电残基的吸引力较小，因此接触时间较短。此外，酰基链的缩短增加了膜的流动性，降低了膜的弯曲刚度，更容易形成曲率半径较小的囊泡。曲率半径较小的磷脂囊泡的外层小叶，头部基团的分布更为疏松，导致表面脂质堆积缺陷更大，单个脂质的平均面积更大，表面的电荷分布更宽，静电势会更低，静电引力更小。 α -Syn 与含有较短酰链的磷脂膜之间的静电相互作用减弱，将使 α -Syn 的膜识别过程更加困难。从宏观角度来看， α -Syn 似乎失去了对较短酰链磷脂的亲和力。这也就能够为实验所得出的结果提供微观机理解释。并且通过对脂质堆积缺陷的定量分析，也可以排除实验中对浅缺陷影响的猜测。

根据前文的分析可以得出一个关于短酰链磷脂如何促进 α -Syn 聚集的大致猜测。RMSD 曲线（图 3-8(b)）表明，与初始构象相比，非膜结合模式下 α -Syn 的构象变化较大，但随后将形成相对稳定的构象并且可以维持较长的时间。不同的是， α -Syn 在膜结合模型中的构象与初始构象相比变化不大，但是无法保持一个稳定的构象，在长时间内构象一直在不断变化，即失去了稳定性。通过构象对比我们可以发现，在膜结合模型中， α -Syn 膜结合部分保持了与初始构象一样的 α -螺旋构象，但没有膜结合部分的构象在溶液中发生了螺旋的解离，这也就是导致与初始构象发生不同程度改变的原因。而在后面长时间的状态中， α -Syn 在膜结合状态下不稳定的构象更容易导致错误折叠，从而导致 α -Syn 的聚集。也就是说，短酰链引起的聚集状态的改变源于膜结合状态的发生，而不是亲和力的改变。由于我们的模型中没有使用全长的 α -Syn，因此膜结合对 α -Syn 整体构象的影响在这里不作深入讨论。本文将在第五章的研究中对这一方面的影响进行深入研究与讨论。

目前我们的模型还存在一些缺陷，虽然所研究的两种混合组分磷脂膜含有不同长度的酰链，但两种膜都处于流体相，在模拟设定的温度下没有相变或相分离。已有报道表明，磷脂膜的相态对 α -Syn 的膜结合和聚集也有很大影响。在这方面，由于模型的局限性，还没有探索。在接下来的工作中将会对相分离以及不同相态的磷脂膜进行研究以获得更多的微观信息。而相分离以及相变就离不开另一种特别重要的脂质——胆固醇，所以我们将对胆固醇对 α -Syn 的膜结合的影响进行研究。

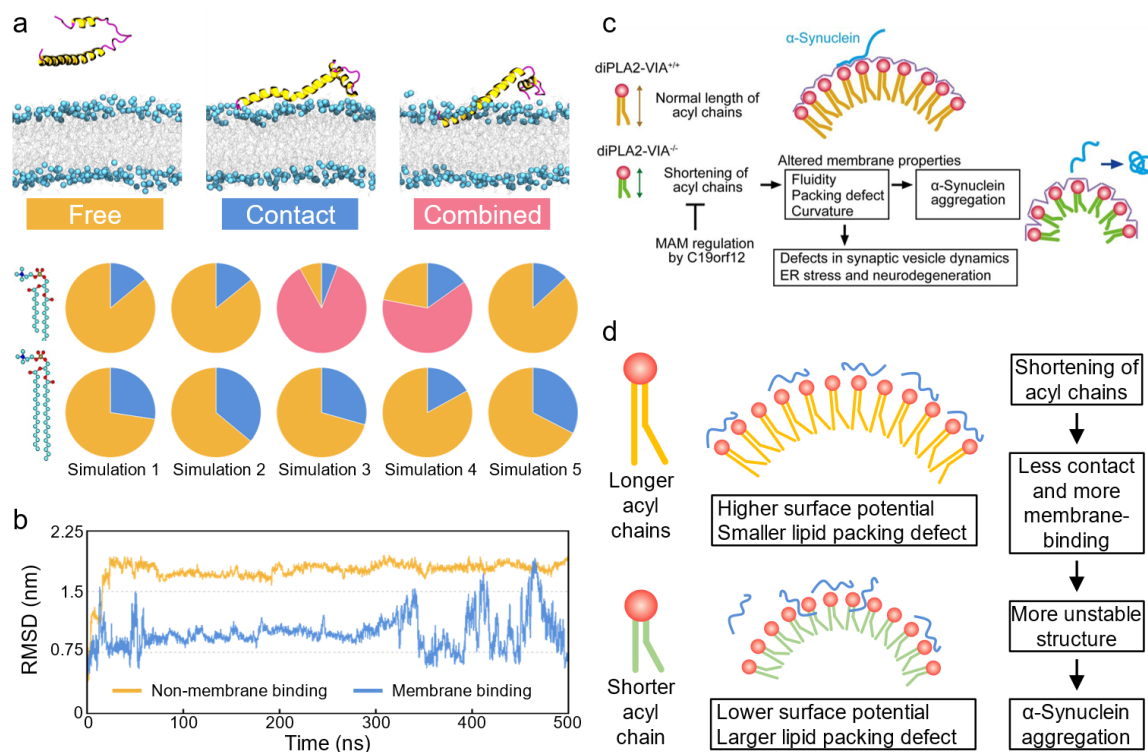


图 3-8 (a) α -Syn₆₀ 与磷脂膜相互作用的三种不同状态示意图及其在总的模拟时长中所占的比例；(b) 膜结合与未膜结合模型中 α -Syn₆₀ 的 RMSD 变化；(c) 实验论文中所提出的假设猜想；(d) 对于酰链缩短引起 α -突触核蛋白聚集的机理猜测

Figure 3-8 (a) Three states of the interaction between α -Syn and lipid membrane and the time of three states during the 500 ns simulation in the 5 independent simulation replicas for the SHORT system and LONG system; (b) The root-mean-square deviation (RMSD) value of the α -Syn; (c) The hypothesis proposed in the experimental paper; (d) Schematic diagram of conjecture on the mechanism of α -Syn aggregation caused by acyl chain shortening

3.6 本章小结

在本研究中，我们利用分子动力学模拟来探讨不同长度的磷脂酰链对 α -Syn 膜结合的影响。结果表明， α -Syn 更容易嵌入到酰链较短的磷脂膜中，嵌入过程的势垒比长酰链的磷脂膜低约 2 kcal/mol。然而，在 α -Syn 与磷脂膜相互作用的整个过程中，从游离态到识别特定磷脂膜再到嵌入磷脂膜的整个过程中，具有较短酰链的磷脂的作用并不总是积极的。我们的研究发现， α -Syn 与磷脂膜的相互作用过程可以分为两部分：一部分是 α -Syn 靠近膜表面的膜识别过程；另一部分是 α -Syn 在识别特定的磷脂膜后逐渐嵌入到磷脂膜中的强结合过程。这两个过程分别以静电相互作用和疏水相互作用为主导。它分别受磷脂膜表面的电荷分布和脂质堆积缺陷的控制。这两方面的差异是由于磷脂头基和尾链的堆积状态不同所致。一方面，磷脂酰链的缩短导致磷脂头部基团在膜中的分布

更加松散，从而导致电荷分布更加松散，静电效应减弱。进而导致 α -Syn 不易接近膜表面，膜识别过程较为困难。另一方面，较疏松的头部基团分布和较接近膜表面的尾链分布导致较大的脂质堆积缺陷，进而促进了 α -Syn 的强结合过程的发生， α -Syn 膜结合状态的出现更加频繁。由于我们所做模型的空间和时间尺度的限制，这两方面影响的作用程度目前还无法判断。还需要进行更多的研究并且与实验结合，确认各种影响因素对膜结合以及膜亲和力的影响。

第4章 胆固醇对 α -突触核蛋白膜相互作用的影响

4.1 模型构建

模型采用 α -突触核蛋白N端主导膜结合的前60个氨基酸(α -Syn₆₀)作为代表,以减小计算模型的空间尺度获得更长的采样时间。我们选择了含有30%胆固醇和不含(0%)胆固醇的两种脂质膜来与 α -Syn₆₀构建模型以实现对比效果,两种模型分别称为0%胆固醇体系和30%胆固醇体系。模型中脂质选择DOPC:DOPE:DOPS=4:3:1的比例构建上下小叶各128个脂质的磷脂双分子层。胆固醇为额外添加30%的胆固醇分子。初始模型见图2-1所示。

4.2 胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合的影响

根据先前的研究报道可知,随着生物体的老化,膜中胆固醇的增加可能会减少 α -突触核蛋白与生物膜的结合。然而,Mahapatra等人发现 α -突触核蛋白的膜结合亲和力在胆固醇含量处于特定值时达到峰值,这说明胆固醇引入了竞争性因素。在这里,我们比较了 α -Syn₆₀在没有胆固醇的脂质膜和含有30%胆固醇的脂质膜中的结合情况,以此来找到胆固醇在 α -突触核蛋白膜结合过程中产生影响的微观机理,并且找到其中的竞争性因素。

在500 ns的模拟过程中, α -Syn₆₀从脂质膜表面附近的位置(图4-1(a))开始朝向脂质膜或背离脂质膜移动。模拟结果表明, α -Syn₆₀在有胆固醇和无胆固醇的情况下都可以与脂质膜发生结合。我们对所有模型中 α -Syn₆₀和脂质膜的相对位置进行了详细的分析,以确定膜结合的发生。例如,我们追踪了 α -Syn₆₀的N末端前15个(或30个)氨基酸的质心运动(图4-1(b)中的蓝色和黄色线条),可以明显看出N末端会逐渐靠近脂质膜,然后在脂质膜表面发生结合(图4-1(b)中的红色和黑色线分别表示脂质膜最上层原子表面和磷原子层的位置),最终会嵌入到脂质膜中。 α -突触核蛋白是一种内禀无序蛋白,但在与脂质膜结合后,我们观察到结合区域保持了 α -螺旋结构。即使在结合过程中螺旋解体,但在膜结合完成后螺旋构象仍然恢复,并且在膜中是稳定存在的。

与第三章中类似,为了定量膜结合事件,如果 α -Syn₆₀的N末端的前15个氨基酸的质心穿过脂质膜表面(图4-1(a)中的红色平面和图4-1(b)中的红线表示)并维持了一段时间,即是“膜结合”状态。另外,我们还统计了在500 ns模拟过程中处于“膜结合”

状态的时间。通过分析 10 个独立的重复模拟，我们没有发现含有 30%胆固醇的脂质膜对 α -Syn₆₀ 的膜结合有明显的增强或抑制作用。如图 4-1(c)和图 4-1(d)所示，对于有无胆固醇的脂质膜体系，都存在发生膜结合和未发生膜结合的模拟结果，而且发生膜结合的概率差异很小。尽管这一结果出人意料，有些令人失望，但这一结果背后存在胆固醇的多方面影响，这对于理解胆固醇在调节蛋白质-膜相互作用中的作用是有意义的，这些多方面的影响将在下一节详细讨论。

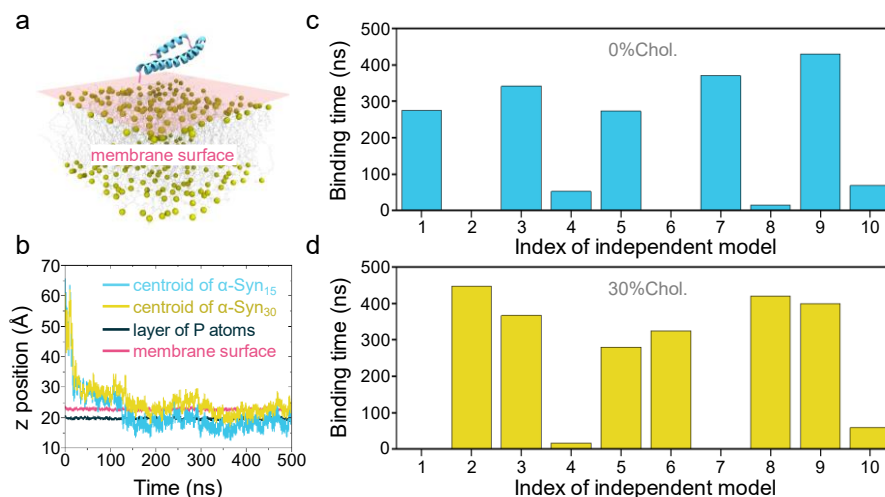


图 4-1 初始模型和膜结合时间；（a）初始构型中 α -Syn₆₀ 和脂质膜的相对位置示意图；磷原子以黄色球表示，磷脂尾链以灰色线表示；（b） α -Syn₆₀ 不同部分（前 15 个残基和前 30 个残基）质心与脂质膜的相对位置演化图；（c）不含胆固醇体系与（d）包含 30%胆固醇体系中 500 ns 模拟时间中的膜结合时间统计图

Figure 4-1 Initial model and membrane binding time. (a) The relative position of α -Syn₆₀ and lipid membrane in the initial model. Phosphorus atoms in lipids are shown in yellow spheres, and phospholipid tails are shown in gray lines. (b) Temporal evolution of the z position of the first 15 (α -Syn₁₅) and 30 (α -Syn₃₀) residues of α -Syn₆₀ and the membrane. The membrane binding time during the 500 ns simulation in the 10 independent simulation replicas for (c) the 0%Chol. system and (d) the 30%Chol. system

虽然发生膜结合的概率显示出微小的差异，但我们发现了另一个有趣的现象：在含有 30%胆固醇的脂质膜中， α -Syn₆₀ 发生结合的区域长度明显缩短（图 4-2(a)和(b)）。在我们的模型中，一些 α -Syn₆₀ 与脂质膜结合并形成稳定的 α -螺旋结构，包括 0%胆固醇体系中的模型 1、3、5、7、9 和 30%胆固醇体系中的模型 2、3、5、6、8、9。这些模型中 α -Syn₆₀ 与脂质膜存在一段时间的稳定的“膜结合”状态。我们计算了这些模型中 α -Syn₆₀ 稳定的 α -螺旋结构的长度（图 4-2(c)），结果表明胆固醇可以显著缩短 α -Syn₆₀ 的膜结合区域的长度。

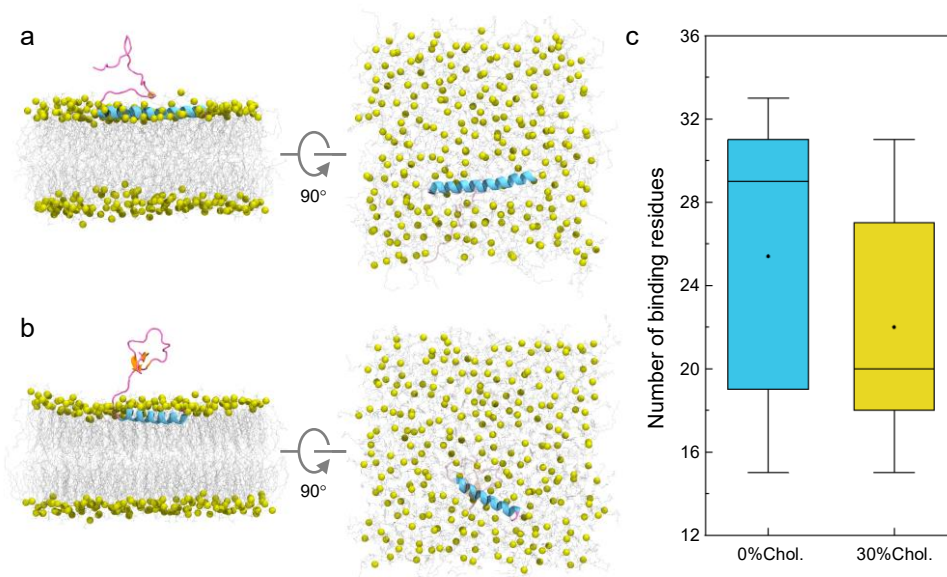


图 4-2 膜结合长度缩短示意图；(a) 不含胆固醇与 (b) 包含 30%胆固醇的体系中 α -Syn₆₀ 的结合状态主视图和俯视图；(c) 多次模拟中发生膜结合的 α -Syn₆₀ 的残基数目统计

Figure 4-2 Shortening of the membrane binding length of α -Syn₆₀; Front view and top view of membrane binding state in (a) the 0%Chol. system and (b) the 30%Chol. system; (c) Membrane binding length (the number of binding residues) of α -Syn₆₀ in two systems

综上所述，我们的模型表明，无论是否含有胆固醇， α -Syn₆₀ 的 N 末端都能以稳定的 α -螺旋结构与脂质膜结合。我们观察到在含有胆固醇的模型中，膜结合略有增强（图 4-1(cd)）。由于计算模拟中模拟次数和模拟时间的限制，样本数量（每个体系 10 个）没有足够大，模拟时间（500 ns）也没有足够长，这很有可能低估了胆固醇对膜结合的积极影响。胆固醇诱导的多种因素都会对我们模型中出现的情况产生不可忽视的影响，我们将在下面的部分中分别阐明这些因素的影响程度及作用机理。此外，胆固醇作用下 α -突触核蛋白结合区域的缩短是有趣而且有意义的，这也将后面的部分进行详细的分析和讨论。

4.3 胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合倾向的多方面影响

同样的，为了了解在这组模型中 α -突触核蛋白膜结合的驱动力，我们追踪了结合过程中的相互作用能变化。以图 4-1(b)所示的模拟体系为例，膜结合发生在 200 ns 左右，在此之前，库仑相互作用主导了 α -Syn₆₀ 与脂质膜的相互作用（图 4-3(a)），表明 α -Syn₆₀ 与脂质膜主要是在库仑相互作用下接近的。这也与本文在上一章中分析所得的结论相同。然后，范德华相互作用（特别是磷脂烃尾与 α -突触核蛋白疏水残基之间的疏水相互作用）

开始发挥作用，这也正对应了范德华相互作用在 200 ns 左右的突然增加（图 4-3(a)）。对其他模型的能量分析也显示了类似的结果。

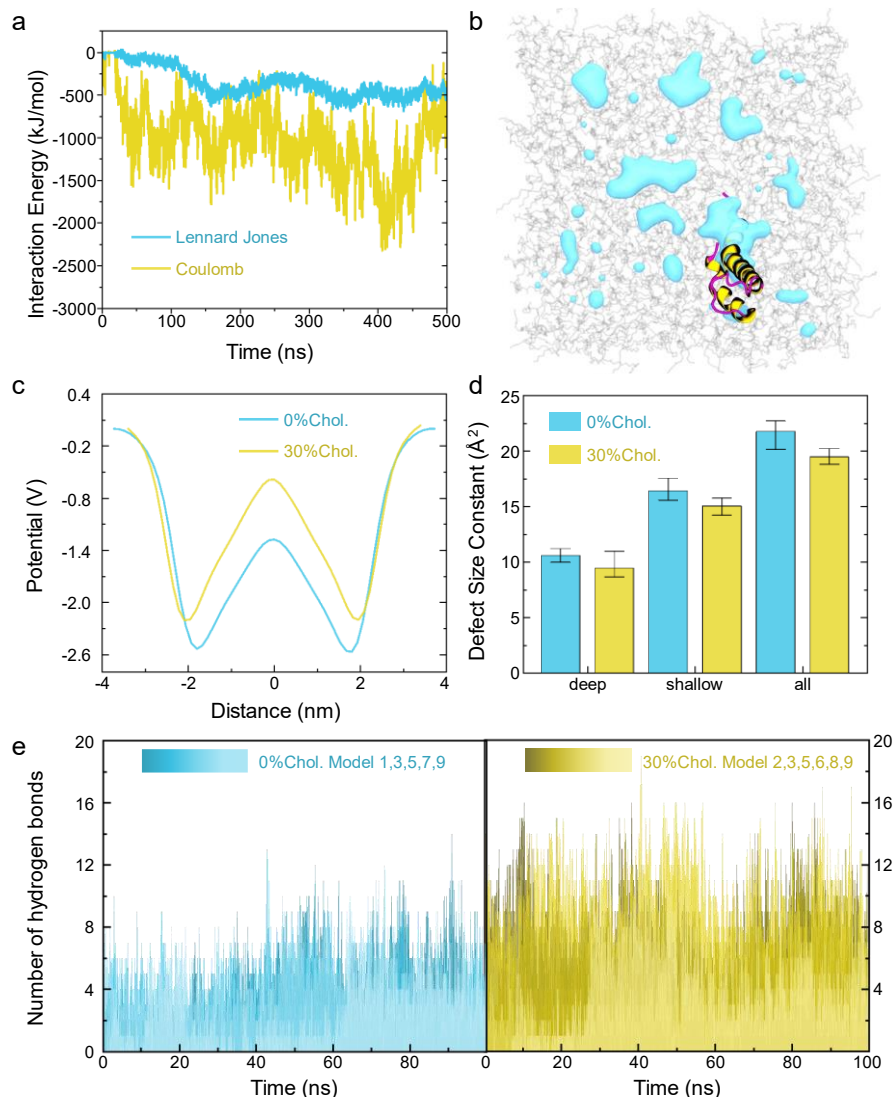


图 4-3 膜结合驱动力；（a）膜结合过程中 α -Syn₆₀ 与脂质膜间的相互作用能变化；（b）膜结合位置与脂质堆积缺陷的相对位置示意图；蓝色区域为脂质堆积缺陷；（c）两种脂质膜在膜法线方向的电势分布；（d）两种脂质膜表面的脂质堆积缺陷常数；（e） α -Syn₆₀ 与脂质膜相互作用早期阶段（前 100 ns）的氢键数量变化

Figure 4-3 The driving force analyses of the membrane binding; (a) Interaction energy between α -Syn₆₀ and lipid membrane; (b) The α -Syn₆₀ membrane binding site is located at the lipid packing defect of lipid membrane; The blue blocks in the figure indicate lipid packing defects; (c) Potential of lipid membrane in the direction perpendicular to the membrane surface; (d) Defect size constant of the two lipid membranes; (e) The hydrogen bond between the α -Syn₆₀ and the lipid membranes during the early stage (the first 100 ns) of membrane binding

因此， α -Syn₆₀ 中带正电荷的氨基酸和带负电荷的磷脂头基之间的长程库仑相互作用使 α -Syn₆₀ 首先接近脂质膜；然后，脂质膜表面的脂质堆积缺陷与 α -Syn₆₀ 的疏水残基相

互作用，驱动 α -Syn₆₀ 与脂质膜的深度结合。我们观察到 α -Syn₆₀ 总是从脂质膜上的脂质堆积缺陷处结合到膜上（图 4-3(b)），这也证实了我们所推测的膜结合途径。此外，膜结合后强烈的疏水相互作用是稳定的 α -螺旋结构的基础。膜结合的轻微增强（图 4-1(cd)）一定是由于胆固醇对这些相互作用的影响所导致的，我们将分别对这几种相互作用进行深入的分析讨论。

4.3.1 库仑相互作用

在我们的体系中，2C18:1 磷脂酸丝氨酸（DOPS）分子为吸引 α -Syn₆₀ 提供负电荷。DOPS 与 α -Syn₆₀ 中的正电荷残基相互吸引并使得 α -Syn₆₀ 逐渐靠近脂质膜。但是脂质膜中加入的 30%胆固醇使负电荷的分布在膜表面变得更稀疏，这有效降低了膜表面的负电势（图 4-3(c)）。因此，胆固醇的加入减弱了膜结合的库仑驱动力。

4.3.2 脂质堆积缺陷

α -Syn₆₀ 接触脂质膜后， α -Syn₆₀ 需要脂质堆积缺陷作为疏水氨基酸的“停机坪”来完成膜结合。如果没有脂质堆积缺陷，或者脂质堆积缺陷太小，不足以容纳足够的 α -Syn₆₀ 的疏水残基， α -Syn₆₀ 可能会从脂质膜上分离，这就是为什么在一些模拟样品中没有观察到膜结合。当然，我们也分析了胆固醇对脂质堆积缺陷的影响。如图 4-3(d)所示，随着胆固醇的加入，深缺陷和浅缺陷都会减少。这很容易理解，因为胆固醇的作用就是让脂质堆积得更紧密。因此，胆固醇也不能通过增加脂质堆积缺陷来促进 α -Syn₆₀ 的膜结合。

4.3.3 氢键相互作用

我们观察到胆固醇对 α -Syn₆₀ 的膜结合有轻微的促进作用，但对库仑相互作用和疏水结合部位的分析表明胆固醇并不是通过这两方面来促进 α -Syn₆₀ 的膜结合。在我们讨论胆固醇和 α -Syn₆₀ 之间的直接相互作用之前，这让我们感到困惑。我们观察到胆固醇分子在脂质堆积缺陷处有所积聚（图 4-4），并且胆固醇头部的羟基可以为 α -突触核蛋白提供额外的氢键相互作用。如图 4-3(e)所示，在两者相互作用的早期（前 100 ns）阶段， α -Syn₆₀ 与含胆固醇的脂质膜之间的氢键明显多于不含胆固醇的脂质膜。尽管胆固醇可以降低膜表面的负电势，从而降低脂质膜对 α -Syn₆₀ 的吸引力，而且脂质堆积缺陷提供的疏水结合部位也在胆固醇的影响下减少，但胆固醇为 α -突触核蛋白提供了额外的氢键相互作用。胆固醇的氢键相互作用与库仑相互作用和脂质堆积缺陷共同驱动 α -突触核蛋白的膜结合。综上所述，这些竞争因素解释了胆固醇对膜结合概率的有限影响。已报道的适宜 α -突触核蛋白发生膜结合的最佳胆固醇含量也应该包括这些多方面的因素。

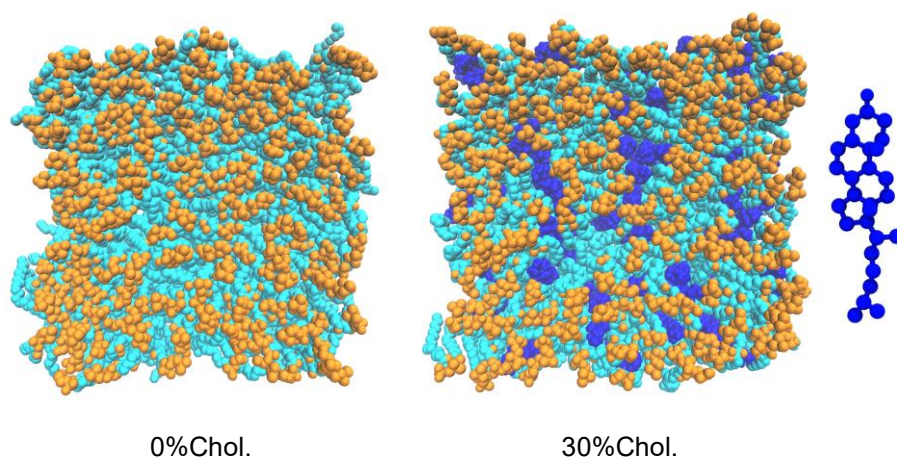


图 4-4 脂质堆积缺陷与胆固醇相对位置示意图

Figure 4-4 Schematic diagram of relative position of lipid accumulation defect and cholesterol

4.4 胆固醇缩短 α -突触核蛋白膜结合区域的机制

如图 4-2 所示，胆固醇可以大大缩短 α -突触核蛋白的膜结合区域的长度。据报道， α -突触核蛋白的膜结合区域长度对于其构象变化（聚集）以及生理功能都存在一定的影响。众所周知， α -突触核蛋白本质上是无序的线条状结构，其结合区域在磷脂烃尾疏水作用的辅助下保持了 α -螺旋结构。一方面，在胆固醇的作用下，磷脂烃尾变得更直、更硬（图 4-5(a)），这也可以从磷脂烃尾的有序度参数大大增加（图 4-5(b)）来证实。因此，脂质膜在胆固醇的影响下更难出现足够大的脂质堆积缺陷（图 4-3(d)），从而难以出现大的疏水区域以容纳足够多的 α -突触核蛋白疏水残基。另一方面，液体脂质膜可以随时调整脂质的堆积状态，以包裹更多的 α -突触核蛋白残基；然而，胆固醇的加入显著降低了脂质的扩散率，如均方位移（图 4-5(c)）所示，并且增加了脂质膜的弯曲刚性（图 4-5(d)），这极大的阻碍了脂质自身调节构象的能力。综上所述，由于胆固醇的存在， α -突触核蛋白嵌入（强结合）到脂质膜中所必需的疏水的脂质堆积缺陷减少且难以扩大，从而导致 α -突触核蛋白发生膜结合区域的长度缩短。

目前的研究表明， α -突触核蛋白膜结合区域长度的调节主要通过 NTD 结构域的一部分以及 NAC 结构域来完成（aa26-97），我们的模型中包含了一部分长度调节区域（aa26-60），并且也明显观察到了膜组分对于膜结合长度的影响，所以我们的观察有力的证明了膜组分与膜结合长度之间的相关性，并且我们揭示了这种现象的产生微观机制。如前所述， α -突触核蛋白的膜结合长度与其聚集也存在一定关系。所以通过模拟获得更

多膜组分对 α -突触核蛋白膜结合长度的影响并总结一般规律有助于构建脂质组学与 α -突触核蛋白病理学之间的桥梁。

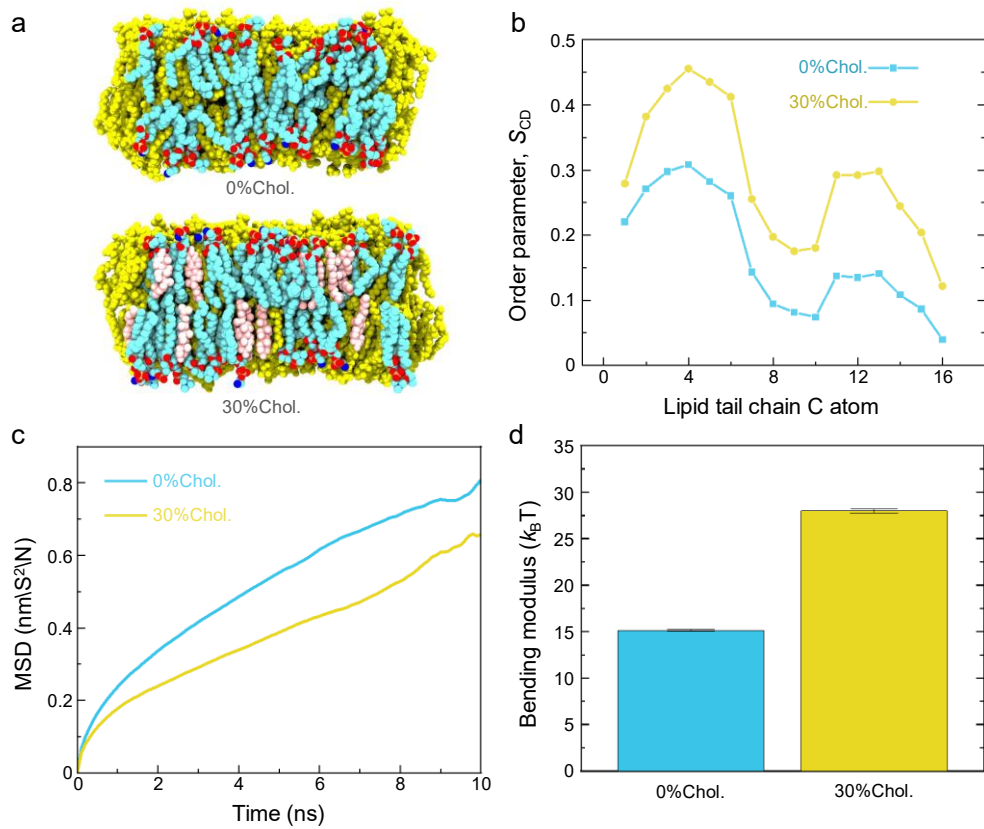


图 4-5 膜结合部分缩短的原因分析；(a) 两种脂质膜中脂质堆积状态示意图；磷脂显示为蓝色球，胆固醇显示为黄色球，黄色球代表背景；(b) 两种膜中的有序度参数；(c) 磷脂的扩散系数 (MSD)；(d) 脂质膜的弯曲刚度

Figure 4-5 Analyses for the shortening of the membrane binding part of α -Syn; (a) The lipid conformation in two lipid membranes; Phospholipids are shown in blue spheres and cholesterol are shown in pink spheres; Yellow spheres indicate lipids in the background; (b) The order parameter of the phospholipid tail chains in the two membranes; (c) Mean square displacement (MSD) of lipids; (d) Bending modulus of the two membranes

4.5 胆固醇对 α -突触核蛋白构象和二级结构的调节

α -突触核蛋白的构象和二级结构决定了其生理功能。此外，帕金森病中出现的 α -突触核蛋白的异常聚集与 α -突触核蛋白的构象和二级结构直接相关。因此，除了膜结合倾向外，胆固醇对 α -突触核蛋白结构的影响也值得探讨。

图 4-6(a) 显示了所有模型中 α -Syn₆₀ 的初始和最终构象。 α -Syn₆₀ 的构象最初是两个 α -螺旋结构，但这种结构并不稳定，因为 α -突触核蛋白本质上是无序的。因此，在模拟的早期阶段，所有模型中的 α -Syn₆₀ 的 RMSD 值都大大增加（图 4-6(b)），这表明 α -Syn₆₀

的二级结构在模拟初始阶段即发生了很大的改变。在没有膜结合的情况下， α -Syn₆₀ 的 N 末端主要是以具有无序线团的螺旋片段的构象存在(如图 4-6(a)所示的未结合的 α -Syn₆₀)。如以上各节所述， α -突触核蛋白的膜结合区域最终会维持稳定的 α -螺旋结构，从图 4-6(a)所示的快照中可以识别出这一结构。因此，对于发生膜结合的模型，当 α -螺旋恢复时， α -Syn₆₀ 的 RMSD 值都会呈现下降的趋势(图 5b 中的蓝线)。在没有胆固醇的情况下，膜结合模型 RMSD 值最终收敛到相似的值，表明 α -Syn₆₀ 的膜结合构象在结构上是相似的；未发生膜结合的模型中的 RMSD 曲线分散，这与其在溶液中游离状态下的无序属性一致。并且也可以发现在胆固醇的影响下，结合区域的稳定 α -螺旋长度缩短，跟我们上一节所讨论的一致。

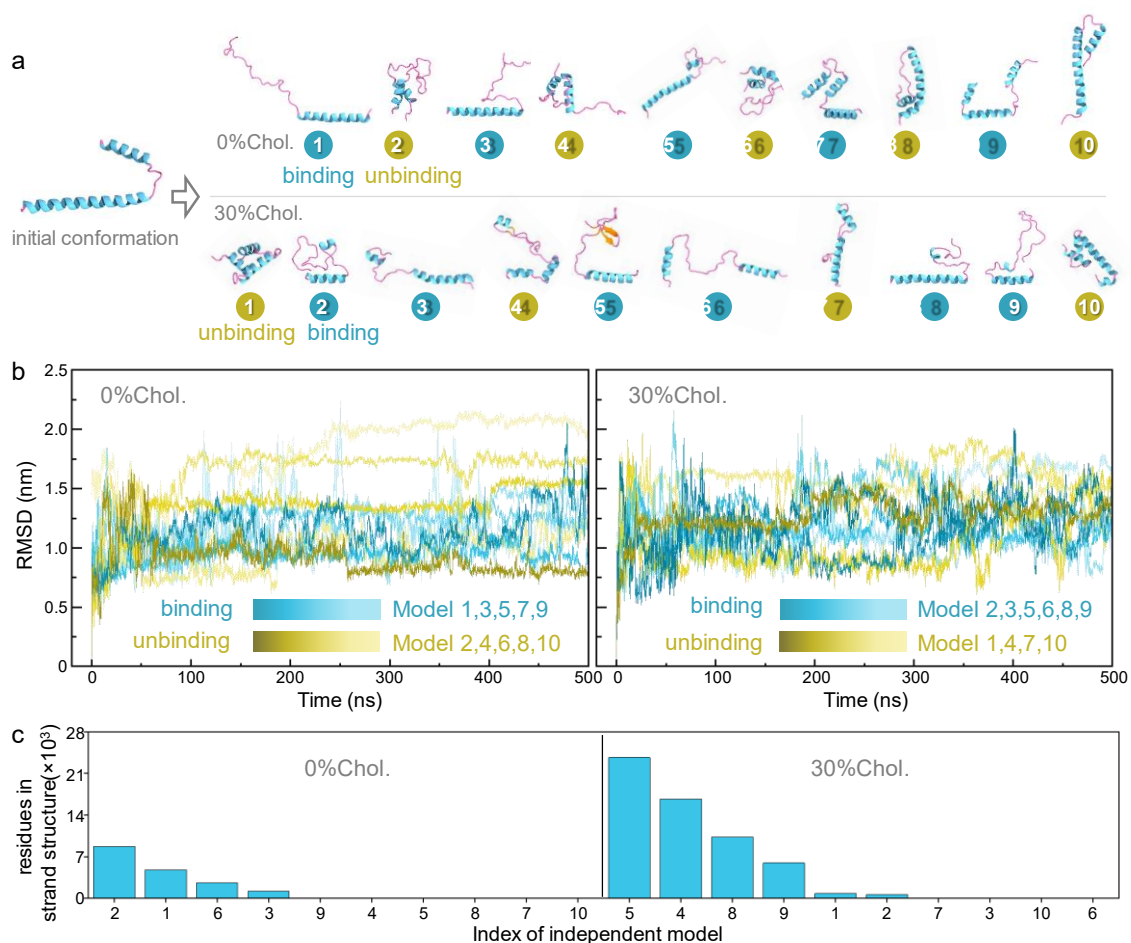


图 4-6 膜结合对 α -突触核蛋白构象和二级结构的影响；(a) α -Syn₆₀ 的初始构象和最终构象；其中膜结合和未结合状态已突出显示；(b) α -Syn₆₀ 的 RMSD 变化图；(c) 模拟中出现 β -Sheet 的残基数统计

Figure 4-6 The influence of membrane binding on the conformation and the secondary structure of α -Syn; (a) The initial and final conformations of α -Syn in all models; The model index for the binding state and the unbinding state is highlighted; (b) The root-mean-square deviation (RMSD) value of the α -Syn in all models; (c) Number of residues to form β -sheet structure

此外，在含胆固醇的模型（30%胆固醇的模型5）中观察到了稳定的 β -Sheet（如图4-6(a)所示），这促使我们统计了500 ns的模拟时间中 α -Syn₆₀形成 β -Sheet结构的数量（每个模型5,000帧）。有趣的是，我们发现在含胆固醇体系的计算模拟中， α -Syn₆₀有更多的残基参与了 β -Sheet的形成（图4-6(c)）。此外， β -Sheet结构更多次出现在含有胆固醇体系的重复模拟中。所以我们可以推断，胆固醇的添加增加了 β -Sheet形成的几率。我们进一步分析了两个体系中 β -Sheet最多的四个模型的二级结构（图4-7）。可以发现，在无胆固醇的模型中， β -Sheet能够在 α -Syn₆₀中形成，但出现的时间不长，形成的位置分散。然而，在含有胆固醇的膜中，形成了更稳定和明显的 β -Sheet结构。这进一步证明了胆固醇促进了 β -Sheet的形成。

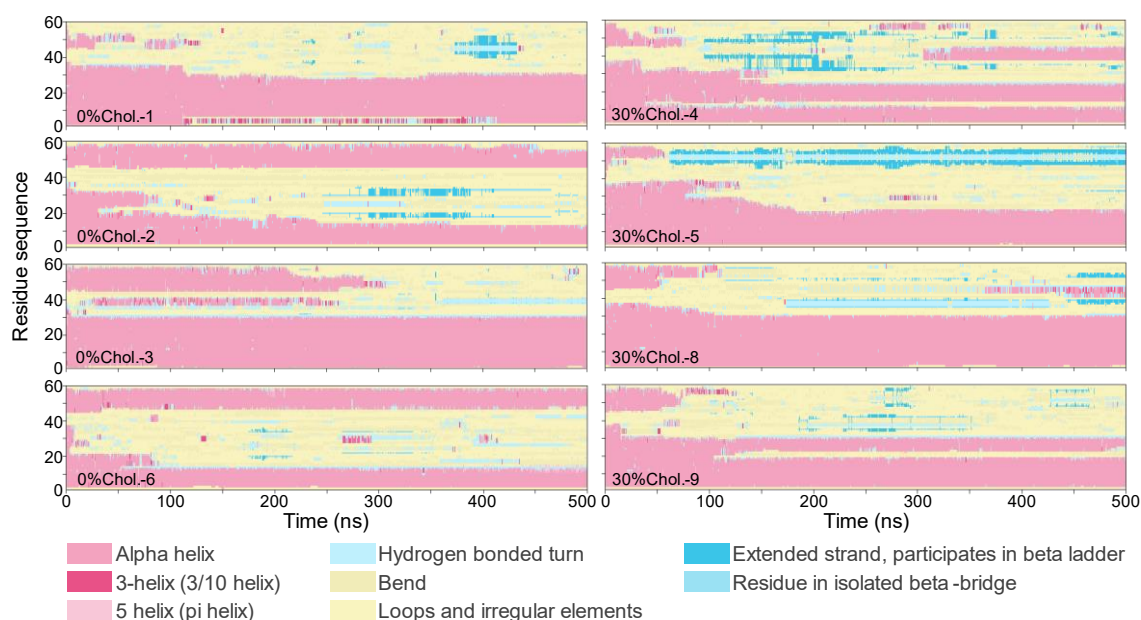


图 4-7 α -突触核蛋白二级结构随时间的演变

Figure 4-7 Evolution of α -Synuclein secondary structure with time

一方面，在胆固醇的作用下， α -突触核蛋白的膜结合部分缩短，留下更多的残基形成 β -Sheet；另一方面， α -突触核蛋白与脂质膜的强结合（嵌入）可能不是形成 β -Sheet的先决条件。例如，在30%胆固醇体系的模型4中， α -Syn₆₀并没有与脂质膜发生强结合，没有部分嵌入到脂质膜中（图4-1(d)和图4-6(a)），但是在这个模型中也大量出现了 β -sheet结构。我们可以发现，它在脂质膜表面稳定吸附，所以我们推测，这种稳定的吸附也有助于 β -Sheet结构的形成（图4-6(c)）。综上所述，胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合的影响也涉及到了 α -突触核蛋白的构象变化。特别是，胆固醇可能促进 β -Sheet结构的形成，而这很有可能与帕金森病患者淀粉样蛋白沉淀的形成有关。

4.6 本章小结

为了评价脂质膜中胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合和构象的影响，我们进行了分子动力学模拟，研究了 α -突触核蛋白与脂质膜之间的相互作用。探究了膜结合路径及其驱动力，深入分析了胆固醇对膜结合的影响。此外，还讨论了在胆固醇作用下 α -突触核蛋白的构象变化。

我们的研究表明，膜结合是由 α -突触核蛋白中带正电荷的残基和带负电荷的磷脂头基之间的库仑相互作用触发的，并被磷脂烃尾和疏水残基之间的疏水作用所增强。 α -突触核蛋白的疏水残基与磷脂烃尾之间的疏水作用加强了 α -突触核蛋白的膜结合。胆固醇为 α -突触核蛋白提供了额外的氢键相互作用，但减弱了库仑相互作用，从而在一定程度上改变了其膜结合倾向。然而，胆固醇显著缩短了 α -突触核蛋白的膜结合部分的长度，促进了 β -Sheet 结构的形成，这对 α -突触核蛋白的病理转变具有重要意义。

据我们所知，这是第一个关于胆固醇对 α -突触核蛋白膜相互作用调节的分子动力学模拟研究。阐明了胆固醇对 α -突触核蛋白与脂质膜的各种相互作用的影响，为进一步研究和探讨胆固醇与 α -突触核蛋白的结合奠定了基础。本工作揭示了胆固醇对 α -突触核蛋白构象的调节作用，有望为揭示 α -突触核蛋白的膜结合与其异常聚集之间的关系提供依据。在此基础上，在未来的分子动力学模拟研究中，探索在不同胆固醇含量下 α -突触核蛋白的膜结合以及淀粉样蛋白的形成，这对于发展脂质组学和了解帕金森病的分子基础具有重要意义。

第 5 章 α -突触核蛋白膜结合后在膜上的聚集及对膜的影响

5.1 模型构建

通过前面的研究我们发现， α -突触核蛋白膜结合后会引发 α -突触核蛋白出现 β -sheet 的结构，而这种结构被认为是淀粉样蛋白的前体。但是，前两章所用的模型只包含了 α -突触核蛋白中的 N 末端（膜结合部分），而据其他研究表明，形成淀粉样蛋白的主要区域位于 NAC 结构域（aa61-95）中。所以，我们重新设计了模型，采用全长的 α -突触核蛋白以及更大的脂质膜模型以探究 α -突触核蛋白的膜结合与 β -sheet 结构的形成之间的关系。此外，有研究证明 α -突触核蛋白会以稳定的膜结合四聚体存在，所以在全长 α -突触核蛋白完成膜结合的基础上我们对模型进行了扩展，获得了四个膜结合的 α -突触核蛋白单体，进而进行膜结合单体聚集（低聚过程）的相关研究。

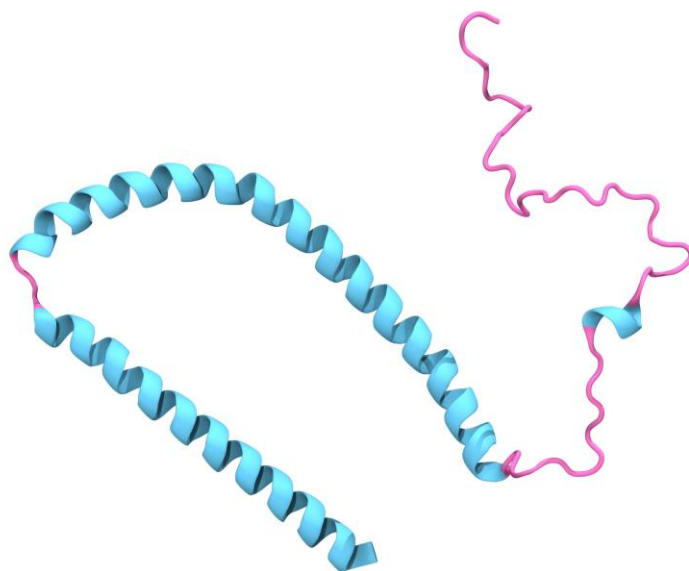


图 5-1 胶束结合的 α -突触核蛋白

Figure 5-1 Micellar-bound α -Synuclein

首先，对于全长 α -突触核蛋白单体膜结合的研究，我们选取了一种折叠较为紧凑（空间体积较小）的 α -突触核蛋白单体作为初始结构以控制模型尺寸（图 5-1）。这种结构的 NTD 以及 NAC 结构域结构与之前使用的结构大致相同，但是其 CTD 结构域折叠更为靠近另外两部分，使得整个模型的空间尺寸更小。脂质膜的成分我们选择了类似于突触囊泡的成分组成，即头基由 PC: PE: PS = 4: 3: 1 组成，尾链选取 2C16:0: 2C18:1: 2C22:6 = 1: 1: 1 的脂肪酸链作为尾部基团，构建了包含九种不同磷脂的脂质膜，共 384

个磷脂分子的脂质双层膜。同样的，构建好的脂质膜经过长时间的模拟使其完全弛豫，并与 α -突触核蛋白进行组装，加入水（TIP3P 模型）以及中和离子（Na 离子）构建初始模型（图 5-2）。

在膜结合 α -突触核蛋白已经形成的基础上，对此模型进行扩展，获得包含四个膜结合 α -突触核蛋白单体的更大的模型。由于构建好的模型尺寸较大，四个 α -突触核蛋白单体距离较远，很难在短时间内发生相互作用，所以我们对 α -突触核蛋白进行牵引，使其逐渐靠近，缩短所需的模拟时间。为了不破坏 α -突触核蛋白未发生膜结合部分的结构，我们选择在膜结合部分与未膜结合部分交点附近的五个残基的质心作为牵引点。经过测试，我们选择 30 KJ/mol/nm^2 作为牵引的力常数，在这个牵引力的作用下 α -突触核蛋白可以发生缓慢的移动，未发生膜结合部分的结构不会发生太大的改变，脂质膜也不会发生很大的形变。经过一段时间的牵引，有两个膜结合 α -突触核蛋白单体发生接触时停止牵引（接触距离判定为 0.3 nm ）。此时的模型作为研究 α -突触核蛋白聚集的初始模型，采用无偏分子动力学模拟进行长时间的采样以研究膜结合 α -突触核蛋白的聚集过程。

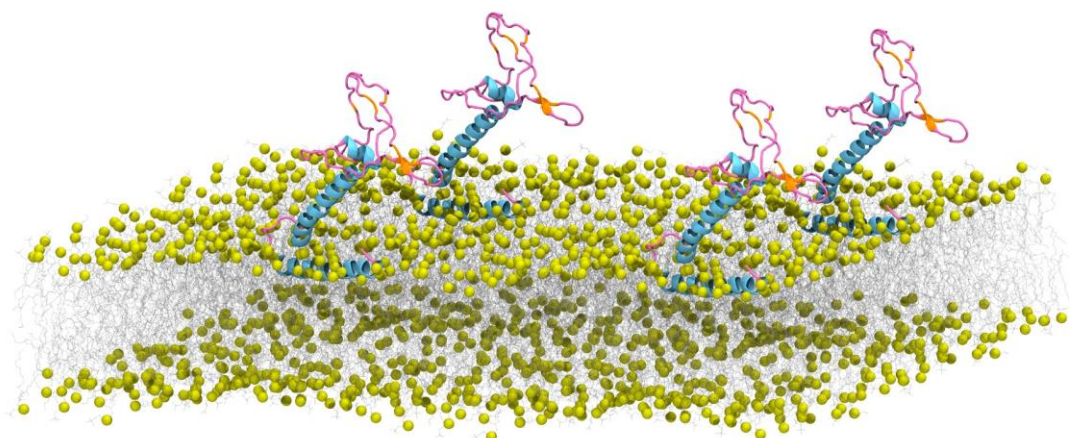


图 5-2 初始模型图

Figure 5-2 Initial model diagram

5.2 全长 α -突触核蛋白的膜结合

全长 α -突触核蛋白的膜结合过程与前面章节研究的截短 α -突触核蛋白的膜结合过程类似。 α -突触核蛋白的 N 末端受到吸引向脂质膜靠近，在膜表面发生识别过程，N 末端遇到较大的脂质堆积缺陷时发生嵌入，最终， α -突触核蛋白的 N 末端约 30 个残基嵌入到脂质膜中，呈 α 螺旋状态。其他未结合部分游离在溶剂中，呈现无序状态。在更长的模拟时间中，膜结合部分以稳定的 α 螺旋状态在脂质膜中运动，未膜结合部分不断发

生解螺旋、折叠等构象变化，在某段时间内可能形成较为稳定的构象，但是在整个模拟时间中（1 μ s）没有稳定的结构存在（图 5-3）。

有趣的是， α -突触核蛋白的未膜结合部分在一段时间内出现了 β -sheet 的结构，这与我们先前的研究结果相一致，并且，这种结构稳定存在了 300 ns 的时间。所以我们猜测是因为膜结合才使得 α -突触核蛋白出现较为稳定的 β -sheet 结构。为了验证这一猜想，我们对比了相同的时间尺度（1 μ s）内膜结合、未发生膜结合、仅有 α -突触核蛋白这三种情况下 α -突触核蛋白的二级结构变化。结果如图 5-3 所示。可以非常明显的发现， α -突触核蛋白只有在膜结合后才会出现稳定的 β -sheet 结构，在仅有 α -突触核蛋白的体系中几乎没有出现 β -sheet 结构，在未发生膜结合的体系中，出现了少量的 β -sheet 结构，但是相对膜结合体系，出现的数量以及维持的时间都有很大的差距。所以我们可以判断：脂质膜的存在会促进 α -突触核蛋白中 β -sheet 的产生，而膜结合会极大地加剧这一影响。

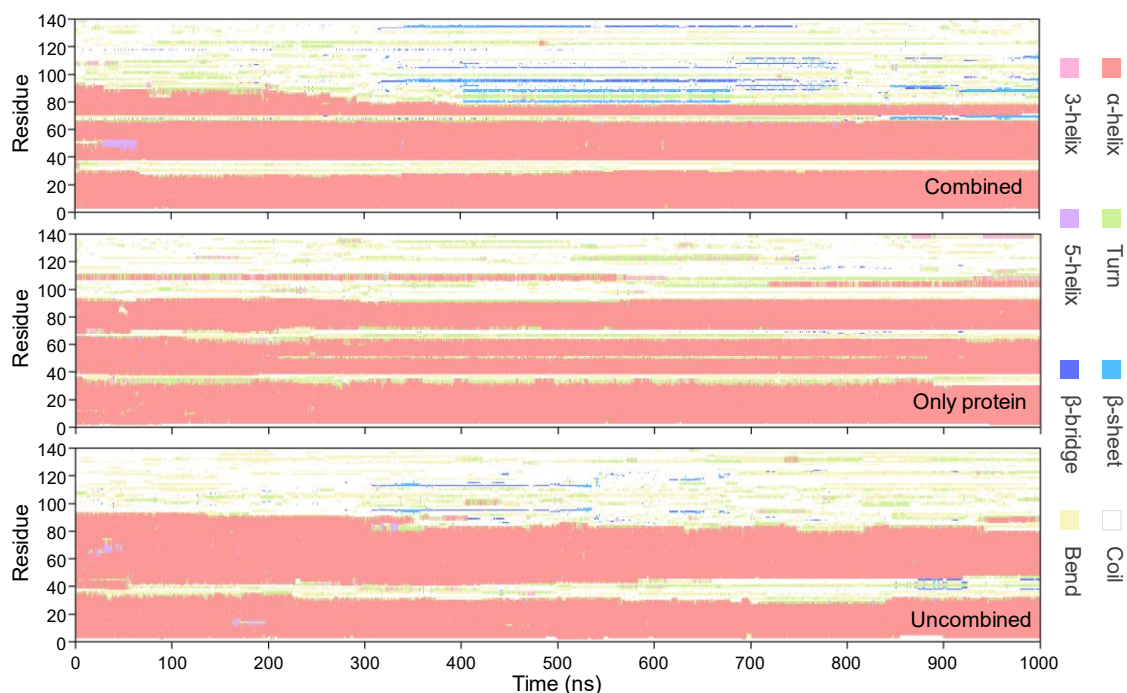


图 5-3 三种不同状态下 α -突触核蛋白的二级结构随时间的演化

Figure 5-3 Evolution of secondary structure of α -Synuclein with time in three different states

接下来我们还想继续探究这一现象出现的微观机制，所以我们对 α -突触核蛋白本身残基间的相互作用情况进行了研究。通过 RMSD 分析我们发现，三个体系中 α -突触核蛋白构象在模拟的最后都趋向于稳定，所以我们对三个体系中 α -突触核蛋白的最终构象进行了残基间的接触分析，如图 5-4 所示。可以明显发现，在膜结合体系中， α -突触核蛋白的 NAC 以及 CTD 结构域本身以及两结构域之间发生了非常多的接触，并且，其

NTD 结构域由于发生了膜结合，与其他两部分接触较少；而在未结合的体系中， α -突触核蛋白的 NTD 与 CTD 结构域发生了非常多的接触，NTD 结构域本身也发生了很多接触；在只有 α -突触核蛋白的体系中，各部分接触均有出现，形成近似于球状的结构。由此，我们可以得出以下结论：1、 α -突触核蛋白的 NTD 与 CTD 的接触可以有效抑制 β -sheet 的形成；2、NAC 与 CTD 结构域的折叠是 β -sheet 产生的原因；3、膜结合有效抑制了 NTD 与 CTD 的接触，促进了 β -sheet 的形成。目前，已有研究提出 α -突触核蛋白 CTD 结构域的截短会促进 α -突触核蛋白的纤维化，这也就从反面证明了 CTD 结构域在阻碍聚集中的重要作用。但是其中的微观机制还不清楚，我们的研究从一个方面为这个现象提供了微观细节，即 CTD 结构域与其他两部分的相互作用缺失是导致 α -突触核蛋白病理性转变的重要原因。

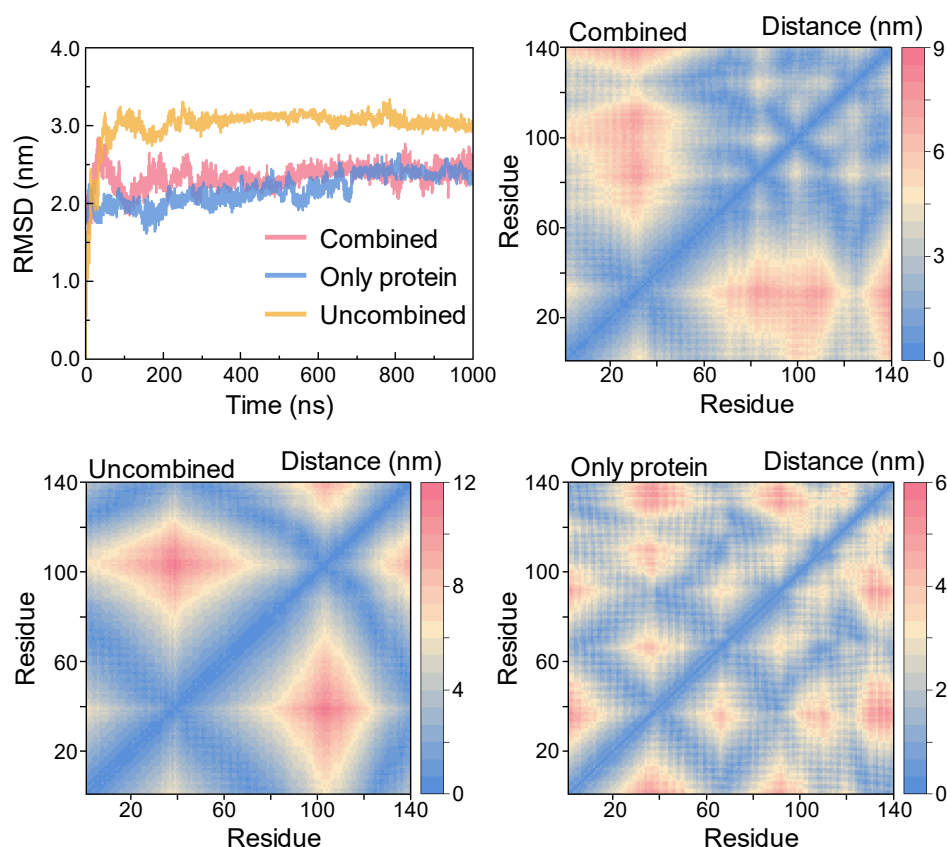


图 5-4 三种状态下 α -突触核蛋白的自身残基间的距离图

Figure 5-4 The distance map between the self-residues of α -Synuclein in three states

膜结合不仅会对 α -突触核蛋白本身产生影响，也会同时对脂质膜结构和性质产生影响。通过对 α -突触核蛋白膜结合部分周围脂质的扩散分析（图 5-5）可以发现，距离 α -突触核蛋白越近，其扩散受到的阻力更大，更不容易扩散到距离更远的地方。也就是说， α -突触核蛋白对其周围的脂质有一定的固定作用，形成类似于“脂筏”的区域。 α -突触

核蛋白周围的磷脂酰丝氨酸脂质聚集程度更高（图 5-5），这是由于磷脂酰丝氨酸脂质的负电头基与 α -突触核蛋白相互吸引所致。有趣的是，单不饱和和多不饱和脂质在 α -突触核蛋白周围的聚集更加明显（图 5-5），饱和脂质分布在更远的位置。有研究表明，这是由于不饱和脂质更能够适应膜结合所引起的形变。由此我们可以推断，在 α -突触核蛋白膜结合部分周围会形成不饱和脂质富集的区域，并且可以随 α -突触核蛋白的运动而移动；而多个膜结合 α -突触核蛋白聚集时，这个不饱和脂富集区域将会更大，将会形成一个非常“软”的膜区域。这个区域将会比其他膜区域更加不稳定，更容易发生形变。

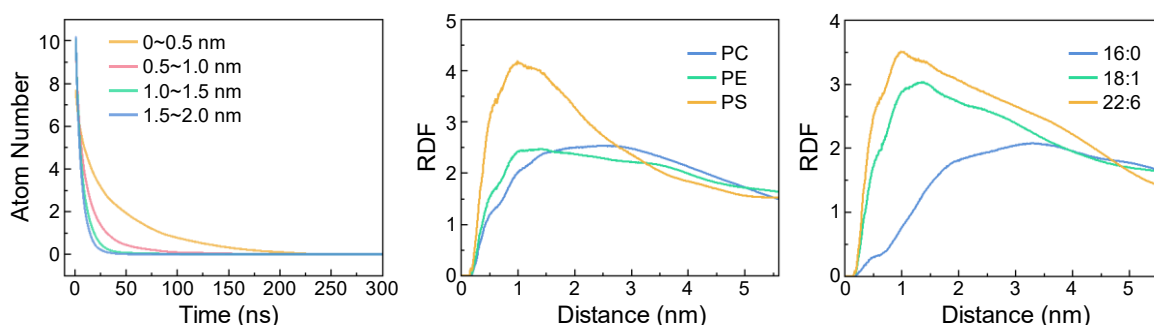


图 5-5 α -突触核蛋白膜结合部分周围脂质的扩散以及分布图

Figure 5-5 Diffusion and distribution of lipids around the membrane binding part of α -Synuclein

5.3 α -突触核蛋白在脂质膜上的聚集

5.3.1 聚集对脂质膜的影响

通过对 α -突触核蛋白单体膜结合的研究我们推测， α -突触核蛋白的聚集将会引起不饱和脂质的富集，并形成更容易发生形变的膜区域。为了验证这个猜想，我们研究了四个膜结合 α -突触核蛋白的聚集。我们推测，膜结合四聚体的形成过程中也会伴随着不饱和脂质富集区域的形成，膜形变也会主要在这个区域中发生。

通过牵引四个单体膜结合 α -突触核蛋白靠近使它们之间产生相互作用，在采样时间内，四个 α -突触核蛋白在膜上不断运动，未发生膜结合的部分之间相互吸引，使得四个 α -突触核蛋白进一步靠近。通过分析四个蛋白两两之间的最小距离可以发现在 1 μ s 的模拟时间内，四个蛋白发生了两次明显的聚集（图 5-6），在图中用浅蓝色和浅黄色区域突出表示。第一次聚集四个蛋白质均参与了聚集，第二次只有三个蛋白参与了聚集，但是第二次聚集持续的时间更长，聚集体更稳定。在有限的模拟时间内并未观察到稳定的膜结合四聚体的形成，可能的原因在于体系中缺少游离的 α -突触核蛋白参与聚集过程，导致膜结合 α -突触核蛋白的相互作用方式过于单一。

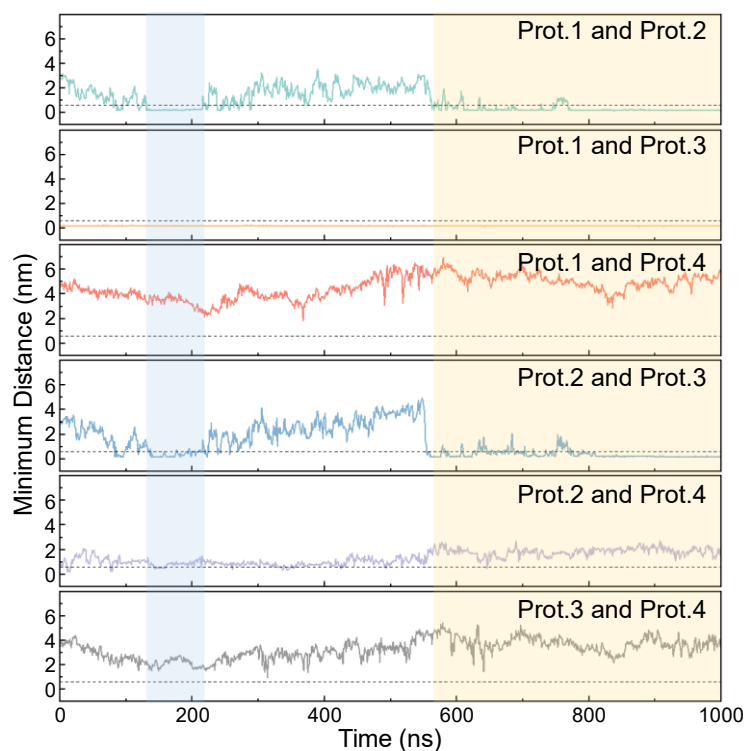


图 5-6 不同 α -突触核蛋白之间最小距离随时间的演化

Figure 5-6 Evolution of the minimum distance between α -Synuclein with time

在两次聚集过程中脂质膜在 α -突触核蛋白聚集的位置都发生了明显的形变（如图 5-7 中的快照所示）。这也证实了我们猜测的在 α -突触核蛋白聚集的区域会出现不饱和脂质富集的情况，脂质膜也更容易在此处发生形变。

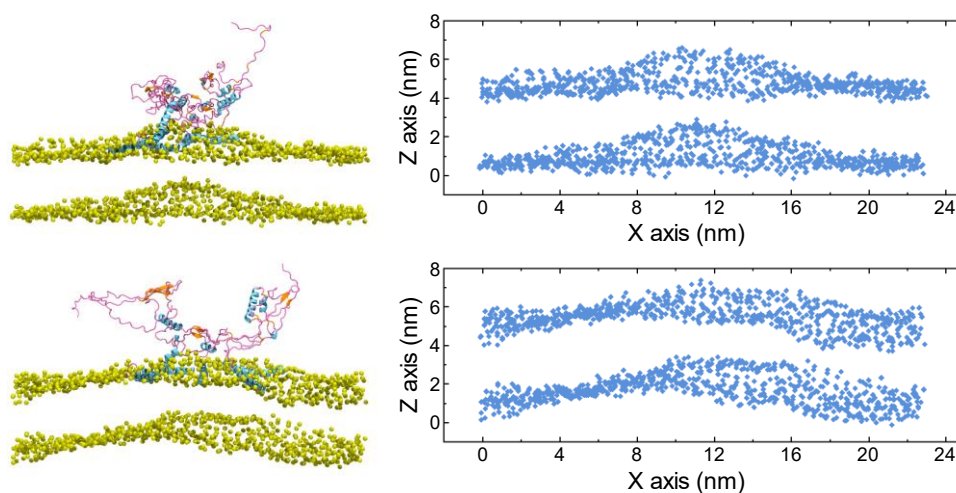


图 5-7 聚集过程中脂质膜弯曲快照及磷原子在 XZ 平面上的位置投影

Figure 5-7 Snapshot of the bending of lipid membrane and position projection of phosphorus atom on XZ plane during aggregation

第一次形变,形变位置较为集中,但是形变程度更高;第二次形变影响的范围更广,曲率变化较小。可以明显看出,第一次聚集聚集体更为紧密,而第二次聚集经过长时间的弛豫,聚集体只有部分紧密结合,大部分呈现游离状态。可以说,膜形变程度与聚集体形态密不可分,另外我们推测聚集体形态与 α -突触核蛋白的结构有明显的联系,所以我们分析了 α -突触核蛋白在模拟过程中的结构变化,并且探究了结构变化的驱动因素。

5.3.2 聚集对 α -突触核蛋白的影响

聚集对 α -突触核蛋白的影响最主要的方面体现在对 α -突触核蛋白结构的影响。从二级结构分析(图 5-8)可以看出,在聚集到解聚的过程中 α -突触核蛋白没有稳定的二级结构,而第二次未参与聚集的 Prot. 4 保持了稳定的二级结构,并且出现了大量的 β -sheet 结构。从这个角度来看,聚集会减少 β -sheet 的形成,也就缺少了淀粉样蛋白的前体,这对于 α -突触核蛋白的纤维化不利,说明低聚可以有效地抑制 α -突触核蛋白向淀粉样蛋白的转变。由此也可以推测,低聚可能是 α -突触核蛋白正常功能的一部分。

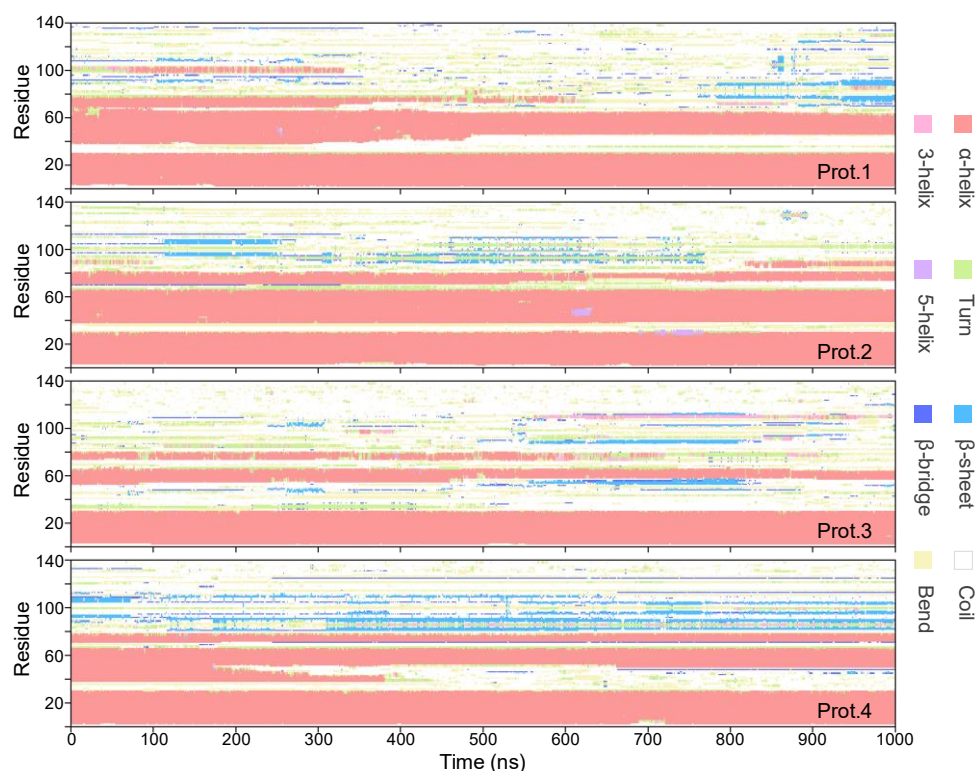


图 5-8 α -突触核蛋白在聚集过程中的二级结构随时间的演化

Figure 5-8 Evolution of secondary structure of α -Synuclein with time during aggregation

通过对 α -突触核蛋白的 RMSD 的分析(图 5-9)可以发现,相对于初始结构,聚集并未对其结构产生突变的影响,这与膜结合所引起的结构变化不同,说明聚集对其结构的影响更加缓慢,但是有良好的持续性。对四个蛋白质的回转半径分析(图 5-9)可以

看出，除 Prot. 2 外，其他 α -突触核蛋白空间尺度变化不大。由这两点可以看出，聚集对 α -突触核蛋白的结构影响没有特别大，所以，膜结合 α -突触核蛋白初始的结构可能会一直影响其聚集过程，聚集更多的是对脂质膜产生影响。

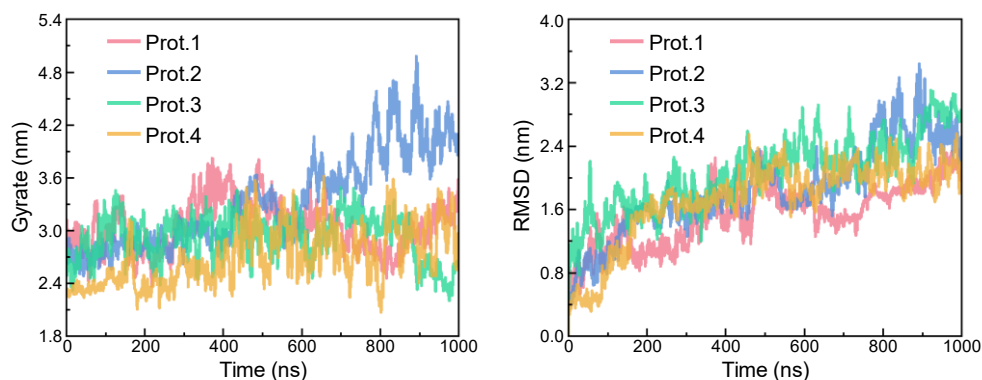


图 5-9 α -突触核蛋白在聚集过程中的回转半径及 RMSD 变化

Figure 5-9 Radius of gyration and RMSD of α -Synuclein during aggregation

接下来我们分析了 α -突触核蛋白聚集的驱动力。主要是从聚集中残基的接触概率来判断，即哪些残基间的相互作用在聚集中起到了主导作用。从接触概率的分析（图 5-10）中可以发现，Prot. 1, 2, 3 之间发生了很多的接触，但是 Prot. 4 只与 Prot. 2 发生了轻微的接触，接触点也比较少。由于缺少了初始的相互作用位点，四聚体的形成难度将高于三聚体。由于模型尺寸的限制，本研究的模型难以在这方面提供更多的信息，但这种现象出现的原因还需要进一步的探究。

通过分析可以确定，发生接触最多的位置位于未结合的 NTD 结构域和 NAC 结构域之间，这在 Prot. 1 和 Prot. 2, 3 的接触中十分明显。我们推测这种相互作用的驱动力主要来自于蛋白质残基本身的性质（正负电荷的吸引）。另外在 Prot. 2 和 Prot. 3 的接触概率图中，接触最多的位置发生在两蛋白的 NAC 结构域之间，这与我们预想的相一致，这种吸引力的来源有很大一部分是 NAC 结构域中 β -sheet 结构相互作用。还有，在 Prot. 1 和 Prot. 2, 3 的接触中，一部分接触发生在 CTD 结构域与未结合的 NTD 结构域之间，以及 CTD 结构域与 NAC 结构域之间，这些接触同样大多来自于正负电荷残基间的相互吸引，稳定性较低。由此可以看出，膜结合 α -突触核蛋白之间的聚集驱动力主要来自于残基间正负电荷的吸引；而另一部分来自于特殊结构，如 β -sheet 结构之间的相互作用所产生的吸引更加稳定。不过，可以肯定的是， α -突触核蛋白的 NAC 结构域在聚集过程中发挥了主导作用。而且，NAC 结构域也是最容易出现 β -sheet 结构的位置。所以，

阻断 α -突触核蛋白的聚集应该着眼于阻断 NAC 结构域的折叠及其与其它部分的相互作用。

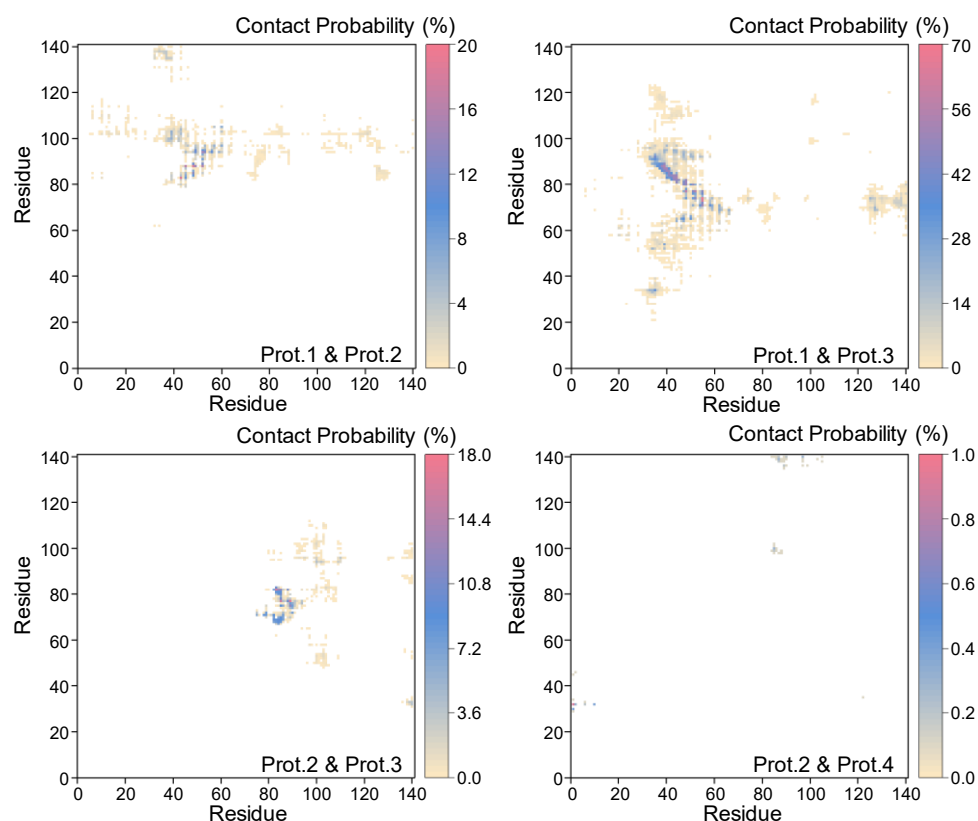


图 5-10 α -突触核蛋白在聚集过程中相互接触的概率

Figure 5-10 The probability of α -Synuclein contacting each other during aggregation

5.4 本章小结

为了探究全长 α -突触核蛋白的膜结合过程以及对脂质膜的影响,进而探究膜结合 α -突触核蛋白的低聚过程,我们利用分子动力学模拟探究了 α -突触核蛋白与脂质膜的相互作用。探究了膜结合对 α -突触核蛋白结构的影响,同时也分析了膜结合对脂质膜结构性质的影响。此外,对膜结合状态下 α -突触核蛋白的聚集过程进行了深入的研究,对聚集驱动力以及参与相互作用的残基进行了分析,对 α -突触核蛋白的结构变化与聚集之间的关系进行了谈论。

本文的研究表明, α -突触核蛋白的膜相互作用以及膜结合都会促进 β -sheet 的形成,这主要是因为膜结合阻断了 NTD 结构域与其他两部分的接触,这使得 NAC 以及 CTD 结构域自身发生折叠的概率增加,促进了 β -sheet 的形成。膜结合使得脂质膜形成富含不饱和脂肪酸的结构域,而且可以跟随 α -突触核蛋白的膜结合部分一起移动,这种类似

于“脂筏”的结构将会在 α -突触核蛋白聚集过程中也发生聚集，并形成更大的特殊性质的区域，这可能是 α -突触核蛋白聚集对脂质膜性质影响的最大部分。这种富含不饱和脂肪酸的结构域更容易发生形变，这可能促进囊泡芽生，是 α -突触核蛋白正常功能的一部分；另外，这也会导致 α -突触核蛋白低聚物更容易穿透膜，是 α -突触核蛋白低聚物细胞毒性的体现。这些猜想还需要更多的研究来证实，但是毫无疑问，这对于理解 α -突触核蛋白的功能以及病理转变有重要意义。

对膜结合 α -突触核蛋白聚集的研究表明， α -突触核蛋白主要通过 NAC 结构域来实现聚集。NAC 结构域之间和 NAC 结构域和未结合 NTD 结构域的相互作用是聚集最主要的驱动力。聚集依赖于聚集之前 α -突触核蛋白的初始结构，而且聚集对其结构的影响较为温和。聚集不会促进 α -突触核蛋白形成更多的 β -sheet 结构，相反的，仅发生膜结合而不参与聚集的 α -突触核蛋白形成了更多的 β -sheet 结构。以 β -sheet 为前体的淀粉样蛋白与低聚物之间存在竞争关系，我们推测低聚物的形成会抑制淀粉样蛋白的形成。并且，本文的研究表明，阻断 α -突触核蛋白的聚集最主要的是限制 NAC 结构域与其他部分的相互作用，这可以为帕金森病药物研发提供更准确的作用位点。

第6章 结论与展望

目前的研究表明， α -突触核蛋白的正常功能以及病理性转变都与其膜相互作用相关。但是目前 α -突触核蛋白的膜结合的微观机理还不清楚，不同性质脂质膜对 α -突触核蛋白膜结合的影响也还不明了，膜结合后 α -突触核蛋白的聚集过程也缺少研究。所以我们采用分子动力学模拟来对 α -突触核蛋白的膜相互作用进行研究，研究了酰链长度以及胆固醇对 α -突触核蛋白膜结合的影响，在此过程中还研究了 α -突触核蛋白的膜结合过程；并且进一步研究了全长 α -突触核蛋白的膜相互作用以及聚集过程。

酰链长度对 α -突触核蛋白膜结合的影响的研究表明， α -Syn 更容易嵌入到酰链较短的磷脂膜中。然而，在 α -Syn 与磷脂膜相互作用的整个过程中，具有较短酰链的磷脂的作用并不总是积极的。 α -Syn 与磷脂膜的相互作用过程可以分为两部分：一部分是 α -Syn 靠近膜表面的膜识别过程，另一部分是 α -Syn 在识别特定的磷脂膜后逐渐嵌入到磷脂膜中的强结合过程。这两个过程分别以静电相互作用和疏水相互作用为主导。它分别受磷脂膜表面的电荷分布和脂质堆积缺陷的控制。这两方面的差异是由于磷脂头基和尾链的堆积状态不同所致。一方面，磷脂酰链的缩短导致磷脂头部基团在膜中的分布更加松散，从而导致电荷分布更加松散，静电效应减弱。进而导致 α -Syn 不易接近膜表面，膜识别过程较为困难。另一方面，较疏松的头部基团分布和较接近膜表面的尾链分布导致较大的脂质堆积缺陷，进而促进了 α -Syn 的强结合过程的发生。

胆固醇对膜结合的影响的研究表明，膜结合是由 α -突触核蛋白中带正电荷的残基和带负电荷的磷脂头基之间的库仑相互作用触发的，并被磷脂烃尾和疏水残基之间的疏水作用所增强。 α -突触核蛋白的疏水残基与磷脂烃尾之间的疏水作用加强了 α -突触核蛋白的膜结合。胆固醇为 α -突触核蛋白提供了额外的氢键相互作用，但减弱了库仑相互作用，从而在一定程度上改变了其膜结合倾向。然而，胆固醇显著缩短了 α -突触核蛋白的膜结合部分的长度，促进了 β -Sheet 结构的形成，这对 α -突触核蛋白的病理性转变具有重要意义。

对全长 α -突触核蛋白的膜结合的研究表明， α -突触核蛋白的膜相互作用以及膜结合都会促进 β -sheet 的形成，这主要是因为膜结合阻断了 NTD 结构域与其他两部分的接触，这使得 NAC 以及 CTD 结构域自身发生折叠的概率增加，促进了 β -sheet 的形成。膜结合使得脂质膜形成富含不饱和脂肪酸的结构域，而且可以跟随 α -突触核蛋白的膜结合部分一起移动，这种富含不饱和脂肪酸的结构域更容易发生形变，这可能促进囊泡芽生，

是 α -突触核蛋白正常功能的一部分；另外，这也会导致 α -突触核蛋白低聚物更容易穿透膜，是低聚物细胞毒性的体现。这些猜想还需要更多的研究来证实，但是毫无疑问，这对于理解 α -突触核蛋白的功能以及病理转变有重要意义。

对膜结合 α -突触核蛋白聚集的研究表明， α -突触核蛋白主要通过 NAC 结构域来实现聚集。NAC 结构域之间、NAC 结构域和未结合 NTD 结构域之间的相互作用是聚集最主要的驱动力。聚集不会促进 α -突触核蛋白形成更多的 β -sheet 结构。以 β -sheet 为前体的淀粉样蛋白与低聚物之间存在竞争关系，低聚物的形成会抑制淀粉样蛋白的形成。

本文的研究阐明了酰链缩短和胆固醇对 α -突触核蛋白膜相互作用影响，为进一步研究和探讨 α -突触核蛋白的膜相互作用提供了思路。本文揭示了膜相互作用对 α -突触核蛋白构象的调节作用，有望为揭示 α -突触核蛋白的膜结合与其异常聚集之间的关系提供依据。而且本文的研究确定了 NAC 结构域与其他部分的相互作用在聚集中的重要性，这可以为帕金森病药物研发提供更准确的作用位点。在此基础上，在未来的分子动力学模拟研究中，探索在不同膜组分下 α -突触核蛋白的膜结合以及淀粉样蛋白的形成，对于发展脂质组学和了解帕金森病的分子基础具有重要意义。

参考文献

- [1] Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2002, 3(12): 932-942.
- [2] Nuber S, Rajsombath M, Minakaki G, et al. Abrogating Native α -Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease[J]. Neuron, 2018, 100(1): 75-90.e75.
- [3] Kalia L V, Lang A E. Parkinson's disease[J]. The Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.
- [4] Krüger R, Eberhardt O, Riess O, et al. Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes?[J]. Trends in molecular medicine, 2002, 8(5): 236-240.
- [5] Lansbury P T, Brice A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2002, 12(3): 299-306.
- [6] Hirsch E C, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Movement Disorders, 2013, 28(1): 24-30.
- [7] Gibb W R, Lees A J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease[J]. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1988, 51(6): 745-752.
- [8] Menšíková K, Matěj R, Colosimo C, et al. Lewy body disease or diseases with Lewy bodies?[J]. npj Parkinson's Disease, 2022, 8(1): 3.
- [9] Spillantini M G, Crowther R A, Jakes R, et al. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(11): 6469-6473.
- [10] Jellinger K A. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease-dementia: current concepts and controversies[J]. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996), 2018, 125(4): 615-650.
- [11] Goldman J E, Yen S-H, Chiu F-C, et al. Lewy Bodies of Parkinson's Disease Contain Neurofilament Antigens[J]. Science, 1983, 221(4615): 1082-1084.

- [12] Lennox G, Lowe J, Morrell K, et al. Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease[J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1989, 52(1): 67.
- [13] Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, et al. Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study[J]. *Acta neuropathologica*, 1988, 75(4): 345-353.
- [14] Schmidt M L, Murray J, Lee V M, et al. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies[J]. *The American journal of pathology*, 1991, 139(1): 53-65.
- [15] Pollanen M S, Bergeron C, Weyer L. Detergent-insoluble cortical Lewy body fibrils share epitopes with neurofilament and tau[J]. *Journal of neurochemistry*, 1992, 58(5): 1953-1956.
- [16] Iwatsubo T, Yamaguchi H, Fujimuro M, et al. Purification and characterization of Lewy bodies from the brains of patients with diffuse Lewy body disease[J]. *The American journal of pathology*, 1996, 148(5): 1517-1529.
- [17] Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M Y, et al. α -Synuclein in Lewy bodies[J]. *Nature*, 1997, 388(6645): 839-840.
- [18] Jakes R, Spillantini M G, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain[J]. *FEBS Letters*, 1994, 345(1): 27-32.
- [19] Clayton D F, George J M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease[J]. *Trends in neurosciences*, 1998, 21(6): 249-254.
- [20] Weinreb P H, Zhen W, Poon A W, et al. NACP, A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively Unfolded[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(43): 13709-13715.
- [21] Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, et al. The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders[J]. *Molecular Neurobiology*, 2013, 47(2): 495-508.
- [22] Ulmer T S, Bax A, Cole N B, et al. Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10): 9595-9603.

- [23] Burré J, Sharma M, Südhof T C. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein[J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2018, 8(3): a024091.
- [24] Lücke C, Gantz D L, Klimtchuk E, et al. Interactions between fatty acids and alpha-synuclein[J]. Journal of lipid research, 2006, 47(8): 1714-1724.
- [25] Varkey J, Isas J M, Mizuno N, et al. Membrane Curvature Induction and Tubulation Are Common Features of Synucleins and Apolipoproteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(42): 32486-32493.
- [26] Gorbatyuk O S, Li S, Nguyen F N, et al. α -Synuclein Expression in Rat Substantia Nigra Suppresses Phospholipase D2 Toxicity and Nigral Neurodegeneration[J]. Molecular Therapy, 2010, 18(10): 1758-1768.
- [27] Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, et al. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 1999, 19(14): 5782-5791.
- [28] Giasson B I, Duda J E, Murray I V J, et al. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions[J]. Science, 2000, 290(5493): 985-989.
- [29] Da Costa C A, Ancolio K, Checler F. Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 $\rightarrow$ Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli[J]. The Journal of biological chemistry, 2000, 275(31): 24065-24069.
- [30] Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, et al. α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration[J]. Cell, 2005, 123(3): 383-396.
- [31] Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, et al. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro[J]. Science, 2010, 329(5999): 1663-1667.
- [32] Cooper A A, Gitler A D, Cashikar A, et al. α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models[J]. Science, 2006, 313(5785): 324-328.
- [33] Soper J H, Kehm V, Burd C G, et al. Aggregation of α -Synuclein in *S. cerevisiae* is Associated with Defects in Endosomal Trafficking and Phospholipid Biosynthesis[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2011, 43(3): 391-405.

- [34] Gosavi N, Lee H J, Lee J S, et al. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion[J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277(50): 48984-48992.
- [35] Thayanidhi N, Helm J R, Nycz D C, et al. α -Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs[J]. Molecular Biology of the Cell, 2010, 21(11): 1850-1863.
- [36] Wu B, Liu Q, Duan C, et al. Phosphorylation of α -synuclein upregulates tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells[J]. Acta histochemica, 2011, 113(1): 32-35.
- [37] Yu S, Zuo X, Li Y, et al. Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells[J]. Neuroscience letters, 2004, 367(1): 34-39.
- [38] Chu Y, Kordower J H. Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease?[J]. Neurobiology of disease, 2007, 25(1): 134-149.
- [39] Guo J T, Chen A Q, Kong Q, et al. Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells[J]. Cellular and molecular neurobiology, 2008, 28(1): 35-47.
- [40] Zeng Q, Cui M. Current Progress in the Development of Probes for Targeting α -Synuclein Aggregates[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2022, 13(5): 552-571.
- [41] Fortin D L, Nemani V M, Voglmaier S M, et al. Neural Activity Controls the Synaptic Accumulation of α -Synuclein[J]. The Journal of Neuroscience, 2005, 25(47): 10913.
- [42] Scott D, Roy S. α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2012, 32(30): 10129-10135.
- [43] Wang L, Das U, Scott D A, et al. α -synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling[J]. Current biology : CB, 2014, 24(19): 2319-2326.
- [44] Lai Y, Kim S, Varkey J, et al. Nonaggregated α -synuclein influences SNARE-dependent vesicle docking via membrane binding[J]. Biochemistry, 2014, 53(24): 3889-3896.

- [45] Larsen K E, Schmitz Y, Troyer M D, et al. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis[J]. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 2006, 26(46): 11915-11922.
- [46] Perutz M F, Harper P S, Ferguson-Smith M A, et al. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 1999, 354(1386): 1101-1118.
- [47] Sahay S, Ghosh D, Dwivedi S, et al. Familial Parkinson Disease-associated Mutations Alter the Site-specific Microenvironment and Dynamics of α -Synuclein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(12): 7804-7822.
- [48] Flagmeier P, Meisl G, Vendruscolo M, et al. Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(37): 10328-10333.
- [49] Polymeropoulos M H, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease[J]. Science, 1997, 276(5321): 2045-2047.
- [50] Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease[J]. Nature Genetics, 1998, 18(2): 106-108.
- [51] Zarranz J J, Alegre J, Gómez-Esteban J C, et al. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia[J]. Annals of Neurology, 2004, 55(2): 164-173.
- [52] Proukakis C, Houlden H, Schapira A H. Somatic alpha-synuclein mutations in Parkinson's disease: Hypothesis and preliminary data[J]. Movement Disorders, 2013, 28(6): 705-712.
- [53] Lesage S, Anheim M, Letournel F, et al. G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian–pyramidal syndrome[J]. Annals of Neurology, 2013, 73(4): 459-471.

- [54] Fujioka S, Ogaki K, Tacik P M, et al. Update on novel familial forms of Parkinson's disease and multiple system atrophy[J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2014, 20: S29-S34.
- [55] Ruiz R, Biea I A, Tabares L. α -Synuclein A30P decreases neurodegeneration and increases synaptic vesicle release probability in CSP α -null mice[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76: 106-117.
- [56] Ruf V C, Nübling G S, Willikens S, et al. Different Effects of α -Synuclein Mutants on Lipid Binding and Aggregation Detected by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy and ThT Fluorescence-Based Measurements[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, 10(3): 1649-1659.
- [57] Lemkau L R, Comellas G, Kloepper K D, et al. Mutant Protein A30P α -Synuclein Adopts Wild-type Fibril Structure, Despite Slower Fibrillation Kinetics[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(14): 11526-11532.
- [58] Fayyad M, Salim S, Majbour N, et al. Parkinson's disease biomarkers based on α -synuclein[J]. *Journal of neurochemistry*, 2019, 150(5): 626-636.
- [59] Chen M, Margittai M, Chen J, et al. Investigation of α -Synuclein Fibril Structure by Site-directed Spin Labeling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(34): 24970-24979.
- [60] Giasson B I, Murray I V J, Trojanowski J Q, et al. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(4): 2380-2386.
- [61] Tuttle M D, Comellas G, Nieuwkoop A J, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(5): 409-415.
- [62] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(23): 11282-11286.

- [63] Masliah E, Iwai A, Mallory M, et al. Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. The American journal of pathology, 1996, 148(1): 201-210.
- [64] Han H, Weinreb P H, Lansbury P T. The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease?[J]. Chemistry & Biology, 1995, 2(3): 163-169.
- [65] Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, et al. Non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic[J]. Biochemistry, 1995, 34(32): 10139-10145.
- [66] El-Agnaf O M, Jakes R, Curran M D, et al. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments[J]. FEBS Lett, 1998, 440(1-2): 71-75.
- [67] Perrin R J, Woods W S, Clayton D F, et al. Interaction of Human α -Synuclein and Parkinson's Disease Variants with Phospholipids: structural analysis using site-directed mutagenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(44): 34393-34398.
- [68] Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, et al. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 307(4): 1061-1073.
- [69] Jao C C, Der-Sarkissian A, Chen J, et al. Structure of membrane-bound α -synuclein studied by site-directed spin labeling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(22): 8331-8336.
- [70] Jensen P H, Nielsen M S, Jakes R, et al. Binding of α -Synuclein to Brain Vesicles Is Abolished by Familial Parkinson's Disease Mutation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41): 26292-26294.
- [71] Bartels T, Ahlstrom L S, Leftin A, et al. The N-Terminus of the Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein Triggers Membrane Binding and Helix Folding[J]. Biophysical Journal, 2010, 99(7): 2116-2124.

- [72] Lautenschläger J, Stephens A D, Fusco G, et al. C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 712.
- [73] Takamori S, Holt M, Stenius K, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle[J]. Cell, 2006, 127(4): 831-846.
- [74] Vargas K J, Schrod N, Davis T, et al. Synucleins Have Multiple Effects on Presynaptic Architecture[J]. Cell reports, 2017, 18(1): 161-173.
- [75] Clayton D F, George J M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease[J]. Trends in neurosciences, 1998, 21(6): 249-254.
- [76] Ahn K J, Paik S R, Chung K C, et al. Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of α -synuclein[J]. Journal of neurochemistry, 2006, 97(1): 265-279.
- [77] Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease[J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012, 2(2): a009399.
- [78] Alza N P, Iglesias González P A, Conde M A, et al. Lipids at the Crossroad of α -Synuclein Function and Dysfunction: Biological and Pathological Implications[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2019, 13: 175.
- [79] Fusco G, De Simone A, Gopinath T, et al. Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): 3827.
- [80] Fusco G, Pape T, Stephens A D, et al. Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein[J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 12563.
- [81] Chandra S, Chen X, Rizo J, et al. A Broken α -Helix in Folded α -Synuclein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(17): 15313-15318.
- [82] Bodner C R, Maltsev A S, Dobson C M, et al. Differential Phospholipid Binding of α -Synuclein Variants Implicated in Parkinson's Disease Revealed by Solution NMR Spectroscopy[J]. Biochemistry, 2010, 49(5): 862-871.

- [83] Middleton E R, Rhoades E. Effects of Curvature and Composition on α -Synuclein Binding to Lipid Vesicles[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 99(7): 2279-2288.
- [84] Galvagnion C, Brown J W P, Ouberaï M M, et al. Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(26): 7065-7070.
- [85] Danzer K M, Kranich L R, Ruf W P, et al. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2012, 7(1): 42.
- [86] Grey M, Dunning C J, Gaspar R, et al. Acceleration of α -Synuclein Aggregation by Exosomes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(5): 2969-2982.
- [87] Bosco D A, Fowler D M, Zhang Q, et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate α -synuclein fibrilization[J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(5): 249-253.
- [88] Perrin R J, Woods W S, Clayton D F, et al. Exposure to Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Triggers Rapid Multimerization of Synucleins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(45): 41958-41962.
- [89] Sharon R, Bar-Joseph I, Frosch M P, et al. The Formation of Highly Soluble Oligomers of α -Synuclein Is Regulated by Fatty Acids and Enhanced in Parkinson's Disease[J]. *Neuron*, 2003, 37(4): 583-595.
- [90] Snead D, Eliezer D. Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes[J]. *Experimental neurobiology*, 2014, 23(4): 292-313.
- [91] Horigome C, Oma Y, Konishi T, et al. SWR1 and INO80 Chromatin Remodelers Contribute to DNA Double-Strand Break Perinuclear Anchorage Site Choice[J]. *Molecular Cell*, 2014, 55(4): 626-639.
- [92] Vincent B M, Tardiff D F, Piotrowski J S, et al. Inhibiting Stearoyl-CoA Desaturase Ameliorates α -Synuclein Cytotoxicity[J]. *Cell reports*, 2018, 25(10): 2742-2754.e2731.
- [93] Buell A K, Galvagnion C, Gaspar R, et al. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(21): 7671-7676.

- [94] Kiechle M, Grozdanov V, Danzer K M. The Role of Lipids in the Initiation of α -Synuclein Misfolding[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 562241.
- [95] Galvagnion C, Buell A K, Meisl G, et al. Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(3): 229-234.
- [96] Allison J R, Varnai P, Dobson C M, et al. Determination of the Free Energy Landscape of α -Synuclein Using Spin Label Nuclear Magnetic Resonance Measurements[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(51): 18314-18326.
- [97] Uversky V N, Li J, Fink A L. Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein: a possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(47): 44284-44296.
- [98] Campioni S, Carret G, Jordens S, et al. The Presence of an Air-Water Interface Affects Formation and Elongation of α -Synuclein Fibrils[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(7): 2866-2875.
- [99] Singleton A B, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease[J]. *Science*, 2003, 302(5646): 841.
- [100] Chartier-Harlin M C, Kachergus J, Roumier C, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease[J]. *Lancet (London, England)*, 2004, 364(9440): 1167-1169.
- [101] Maraganore D M, De Andrade M, Elbaz A, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease[J]. *Jama*, 2006, 296(6): 661-670.
- [102] Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, et al. Genetic variability in the SNCA gene influences α -synuclein levels in the blood and brain[J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(5): 1327-1334.
- [103] Mokretar K, Pease D, Taanman J-W, et al. Somatic copy number gains of α -synuclein (SNCA) in Parkinson's disease and multiple system atrophy brains[J]. *Brain*, 2018, 141(8): 2419-2431.

- [104] De Lau L M L, Breteler M M B. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. The Lancet Neurology, 2006, 5(6): 525-535.
- [105] Collier T J, Kanaan N M, Kordower J H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2011, 12(6): 359-366.
- [106] Rappley I, Myers D S, Milne S B, et al. Lipidomic profiling in mouse brain reveals differences between ages and genders, with smaller changes associated with α -synuclein genotype[J]. Journal of neurochemistry, 2009, 111(1): 15-25.
- [107] Ledesma M D, Martin M G, Dotti C G. Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival[J]. Progress in Lipid Research, 2012, 51(1): 23-35.
- [108] Gaspar R, Pallbo J, Weininger U, et al. Ganglioside lipids accelerate α -synuclein amyloid formation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2018, 1866(10): 1062-1072.
- [109] Seyfried T N, Choi H, Chevalier A, et al. Sex-Related Abnormalities in Substantia Nigra Lipids in Parkinson's Disease[J]. ASN Neuro, 2018, 10: 1759091418781889.
- [110] Schneider J S, Gollomp S M, Sendek S, et al. A randomized, controlled, delayed start trial of GM1 ganglioside in treated Parkinson's disease patients[J]. Journal of the neurological sciences, 2013, 324(1-2): 140-148.
- [111] Schneider J S, Cambi F, Gollomp S M, et al. GM1 ganglioside in Parkinson's disease: Pilot study of effects on dopamine transporter binding[J]. Journal of the neurological sciences, 2015, 356(1-2): 118-123.
- [112] Schneider J S, Aras R, Williams C K, et al. GM1 Ganglioside Modifies α -Synuclein Toxicity and is Neuroprotective in a Rat α -Synuclein Model of Parkinson's Disease[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8362.
- [113] Fanning S, Selkoe D, Dettmer U. Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy?[J]. npj Parkinson's Disease, 2020, 6(1): 3.

- [114] Dettmer U, Newman A J, Soldner F, et al. Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation[J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 7314.
- [115] Rovere M, Powers A E, Jiang H, et al. E46K-like α -synuclein mutants increase lipid interactions and disrupt membrane selectivity[J]. The Journal of biological chemistry, 2019, 294(25): 9799-9812.
- [116] Shahmoradian S H, Lewis A J, Genoud C, et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes[J]. Nature Neuroscience, 2019, 22(7): 1099-1109.
- [117] Fares M-B, Ait-Bouziad N, Dikiy I, et al. The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells[J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(17): 4491-4509.
- [118] Hospital A, Goñi J R, Orozco M, et al. Molecular dynamics simulations: advances and applications[J]. Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC, 2015, 8: 37-47.
- [119] Tsigelny I F, Bar-On P, Sharikov Y, et al. Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(7): 1862-1877.
- [120] Mihajlovic M, Lazaridis T. Membrane-bound structure and energetics of α -synuclein[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008, 70(3): 761-778.
- [121] Manna M, Murarka R K. Polyunsaturated Fatty Acid Modulates Membrane-Bound Monomeric α -Synuclein by Modulating Membrane Microenvironment through Preferential Interactions[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(4): 675-688.

攻读硕士学位期间取得的研究成果

攻读硕士学位期间发表的学术论文

- [1] **Ziqiang Qi**, Menglin Wan, Jun Zhang, Zhen Li. Influence of Cholesterol on the Membrane Binding and Conformation of α -Synuclein[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2023, 127(9): 1956-1964.
- [2] Zhen Li, Junfeng Wang, Qi Wei, **Ziqiang Qi**, Lixia Zhou, Jiawei Li. In silico insights into the receptor-mediated endocytosis of virus-like nanoparticles[J]. Chemical Physics Letters, 2022, 790: 139360.

致 谢

在我即将毕业之际，我深深地感悟到，这一路上的艰辛和付出都是值得的。从开始的无知和茫然，到现在的明确和坚定，这段旅程让我收获了很多。我想借此机会向所有曾经在我的学业和生活中给予支持和帮助的人们致以最诚挚的谢意。

在这三年时间里，我学习了很多专业知识，也深入了解了学术研究的过程和方法。一路走来，遇到了大大小小数不清的问题和麻烦，不过现在回头看去，不只是遇到麻烦的不知所措，更是解决问题的成就与喜悦。历经坎坷后才知道，路虽远，行则将至。

有幸在这三年结识了很多优秀的同学和老师。他们的知识、经验和思想都对我产生了深刻的影响，他们也给予了我无数的支持、鼓励和帮助。

首先真诚的感谢恩师张军教授三年多来的悉心指导，张老师在整个硕士研究期间给予了我最大的支持和指导，不仅在学术研究上给我提供了宝贵的意见和建议，还在生活中给予了我关心和帮助。另外还要感谢李振老师在科学研究、论文写作、未来规划上的悉心指导。从李老师身上学习到了太多太多，李老师的言传身教让我真正的走近了科研这一途。最后，感谢课题组优良的平台和浓厚的学术氛围使我的研究生生活充实而又开心，也要感谢课题组其他老师对我的指导和帮助。

当然还要感谢我的同学和朋友们。在学习和生活中，他们一直是我最好的伙伴和支持者。在他们的帮助下，我克服了许多困难，度过了许多难忘的时光。感谢我的研一舍友们七年的陪伴，何其有幸遇到诸君，幸甚至哉。最后的最后还要感谢我的父母和家人。他们一直是我坚实的后盾，为我提供了无微不至的关爱和支持。没有他们的支持，我不可能顺利完成这段旅程。文字在这时总是显得那么无力，不及我想表达之万一。再次感谢遇到的每一个人。

我觉得还应该感谢一下自己，感谢一直没有放弃学习的自己，感谢没有被任何困难打倒的自己，感谢一直充满希望的自己。这三年，从一个两百多斤的胖子成为了一个不太健康的瘦子，从一个对科研毫无概念的大学生成长为了一个可以发表学术论文的研究生。不止一次感慨这三年过得太快太快，可能是疫情夺走了太多值得纪念的时光，不过也因为疫情有更多时间好好学习，认真科研。对自己这三年不太满意的点在于结束时并没有达到我给自己规划的目标，不过，好在我一直在前进。有意思的永远不是达成目标时的一时惊喜，最好的风景在一路走来时我已经看过了。我收获的毅力、坚韧、认真等

等等等的东西已经刻进骨子里了，我相信这些都会在以后给予我最大的帮助。想对三年前的自己说，还好你当时选了读研，虽然没有认真考虑，但是，结局还不错。

人生如逆旅，我亦是行人。希望下次再有空想这些是因为一路繁花。