

细菌 CsgA 蛋白促进 α -Syn 聚集

孟兰霞 刘聪聪 张振涛

【摘要】 目的 探讨细菌 CsgA 蛋白对 α -synuclein (α -Syn) 聚集的影响及 CsgA 蛋白促进帕金森病发生的可能机制。**方法** 在 1.5 mg/mL 的 α -Syn 单体蛋白中加入终浓度为 0.01 mg/mL 的 CsgA 蛋白 R1 结构域,采用硫黄素 T 染色法检测 α -Syn 的聚集;透射电镜分别观察 R1, α -Syn 和 R1- α -Syn 混合纤维的形态;分别将 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 混合纤维转入稳定表达 GFP 标签的 α -Syn 的 HEK293(Syn293)细胞中,观察对 α -Syn 聚集体形成的影响;分别用 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 混合纤维诱导 Syn293 细胞内形成聚集体,采用免疫荧光染色观察 α -Syn 聚集体是否具有路易小体的特征。**结果** R1 蛋白可以明显促进 α -Syn 的聚集,并且这种聚集体具有路易小体的特征。**结论** 细菌蛋白 CsgA 可促进 α -Syn 的聚集,这可能是细菌感染促进帕金森病发生的重要机制。

【关键词】 细菌 CsgA R1 结构域 帕金森病 α -突触核蛋白

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)05-0401-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.05.001

Bacterial protein CsgA accelerates α -synuclein aggregation Men Lanxia, Liu Congcong, Zhang Zhentao.
Departmental of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To explore the effect of bacterial protein CsgA on the aggregation (α -Syn), and to illustrate the molecular mechanisms by which CsgA promote the onset of PD. **Methods** Experiment # 1: The aggregation of α -Syn (1.5 mg/ml) in the presence or absence of 0.01 mg/ml R1 as monitored by Thioflavin T fluorescence assay. Experiment # 2: The structure of the R1 pre-formed fibrils (PFFs), α -Syn PFFs, and R1- α -Syn mixed PFFs were observed by electron microscopy. Experiment # 3: α -Syn PFFs and R1- α -Syn mixed PFFs were transduced into HEK293 cells stably transfected with GFP- α -Syn (Syn293 cells). The formation of insoluble α -Syn aggregation was recorded. Experiment # 4: The characterization of intracellular aggregates induced by α -Syn PFFs and R1- α -Syn PFFs were investigated by immunofluorescence. **Results** R1 fragment of CsgA significantly promoted the aggregation of α -Syn. The R1-induced α -Syn PFFs show enhanced seeding activity in Syn293 cells. The aggregated induced by α -Syn PFFs and R1- α -Syn PFFs show characteristics of Lewy bodies. **Conclusion** R1, the key domain of CsgA, accelerates the aggregation of α -Syn. The CsgA-induced aggregation of α -Syn may play a role in the pathogenesis of Parkinson's disease.

【Key words】 Bacteria CsgA R1 domain Parkinson's disease α -Synuclein

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界上第二大神经退行性疾病,65 岁以上的老年人的发病率高达 1.6%^[1]。PD 的主要病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元的丢失,残存神经元内出现路易小体^[2]。路易小体的主要成分是异常聚集的 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)。近年来的研究发现, α -Syn 异常聚集是介导路易小体病理形成和多巴胺能

神经元变性的重要分子机制。遗传因素和环境因素都可能促进 α -Syn 的异常聚集和 PD 的发病^[3]。A-Syn 基因 SNCA 的突变和扩增可导致家族性 PD^[4],但是对于散发性的 PD 患者来说,诱导 α -Syn 异常聚集的原因仍不清楚。

临床和流行病学调查数据显示, α -Syn 的聚集可能首先发生在周围神经系统,然后再由周围神经系统传播到脑内^[5]。很多 PD 患者在出现运动症状之前会有便秘或者其它肠道功能紊乱的症状^[6-9]。A-Syn 聚集体一旦形成,可以作为种子诱导更多的 α -Syn 蛋白形成聚集体,近年来也有证据表明异源

基金项目:国家自然科学基金项目(81901090)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[孟兰霞 刘聪聪 张振涛(通信作者)]

性淀粉样蛋白也可以促进其他蛋白的聚集^[10]。大肠杆菌表面的 Curli 蛋白是一种淀粉样蛋白,而且 Curli 蛋白的 1 个亚基 CsgA 蛋白可能与 α -Syn 病变存在关系^[11]。但是 CsgA 蛋白促进 α -Syn 聚集的分子机制及其在 α -Syn 聚集和播散中的关系尚未明确。为了明确 CsgA 蛋白促进 α -Syn 聚集的结构域,本研究使用化学合成 CsgA 的 R1 结构域,分别采用不同的方法在体外模型中验证 R1 结构域是否能够促进 α -Syn 的聚集,以期 PD 的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞

稳定表达 α -Syn 的 HEK293 细胞由本实验室构建。

1.2 主要试剂和仪器

CsgA 蛋白的 R1 片段 (SELNIYQYGGGN-SALALQTDARN) 由上海强耀生物有限公司合成; 硫黄素 T (Sigma; 596200); α -Syn-pS129 抗体 (Biolegend; # MMS-5091); 泛素抗体 (Cell signaling technology; 3936S); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自 BioFRox 公司 (EZ3412B205); 荧光显微镜购自 OLYMPUS。

1.3 α -Syn 聚集的检测

利用文献报道的方法表达和提纯 α -Syn 单体^[12],并溶解在磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 溶液中,使其终浓度为 1.5 mg/mL,向其中 1 组加入终浓度为 0.01 mg/mL 的 R1 片段蛋白,另外 1 组加入等体积的 PBS; 放在 37 °C 摇床中,1 000 r/min 搅拌,每隔一段时间取出 10 μ L 反应产物加入到 90 μ L 的 PBS 中,再加入终浓度为 20 μ M 的硫黄素 T,混匀; 采用酶标仪检测,激发光 450 nm,发射光 510 nm。

1.4 透射电镜观察不同纤维的形态

分别将 R1 纤维、 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 混合纤维滴到碳涂层铜网上,然后快速地用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (TRIS hydrochloride, Tris-HCl) (50 mM, pH 7.4) 缓冲液洗 2 遍,0.75% 甲酸铈酰处理 30 s,待铜网晾干,在 Hitachi HT7800 透射电镜下观察。

1.5 不同的纤维转导 Syn293 细胞

分别取 5 μ g 的 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 混合纤维,利用 PBS 稀释 10 倍,水浴超声 1 h; 然后加 90

μ L 的减血清培养基 (Minimal essential medium, opti-MEM),再加入 4 μ L 的脂质体 2000 转染试剂 (Lipofectamine 2000 Reagent, Lipo 2000),混匀,静置 20 min,将培养的 Syn293 细胞消化下来,细胞悬液加入铺有细胞爬片的 6 孔板中,然后再将配好的转导混合物体系加入细胞中,混匀,继续培养 48 h,显微镜观察聚集体的形成。

1.6 免疫荧光染色

将每一组经过不同纤维处理的 Syn293 细胞经 PBS 漂洗后采用 4% 多聚甲醛 + 1% 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (TRIS hydrochloride, Triton X-100) 固定透化 15 min,去除可溶性的 α -Syn, PBS 漂洗 3 次,5 min/次,3% 的牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 1 h,与不同的抗体 4 °C 孵育过夜; 本实验中使用的抗体有鼠抗 α -Syn-pS129 (pS129) (1 : 1 000) 和鼠抗泛素 (Ubiquitin) (1 : 1 000); 第 2 d PBS 洗 5 次,5 min/次,荧光二抗避光孵育 2 h, PBS 洗 5 次,5 min/次,洗完后染 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (1 : 10000),室温孵育 2 min, PBS 洗 3 次,5 min/次,加抗荧光淬灭剂进行封片,荧光显微镜下观察。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 统计学分析软件,所有的数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验,多组数据比较分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 CsgA 蛋白的 R1 片段促进 α -Syn 的聚集

为了研究 CsgA 的 R1 片段是否能够促进 α -Syn 的聚集,本研究将 α -Syn 的单体蛋白中加入终浓度为 0.01 mg/mL R1 蛋白,分别在 0、10、18、24、36、44、52、56、64、76、84 和 92 h 时间点取样进行 ThT 检测显示,加入了 R1 蛋白片段的实验组相对于单独的 α -Syn 组明显地促进了 α -Syn 的聚集 (图 1)。为了进一步地明确 R1 促进 α -Syn 形成纤维是否具有独特的结构特征,本研究采用透射电镜技术观察不同纤维的形貌,发现 R1- α -Syn 复合纤维与单独的 R1 纤维和 α -Syn 纤维的结构均不相同 (图 1)。

2.2 R1- α -Syn 复合纤维具有更强的诱导聚集能力

前期的电镜观察显示 R1- α -Syn 复合纤维与单

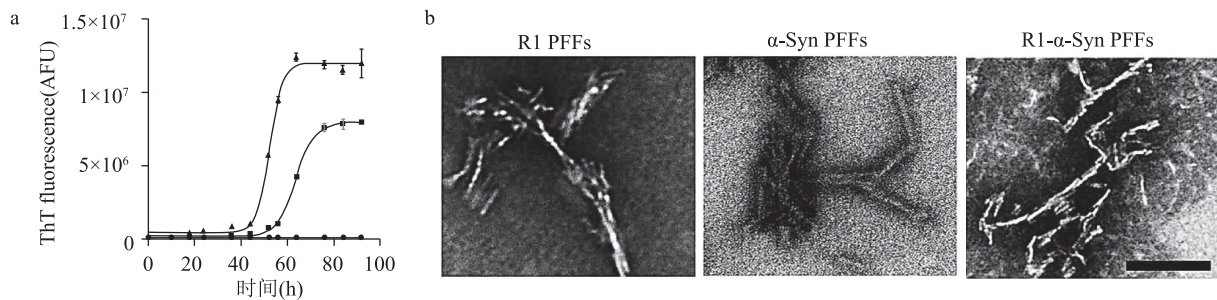


图 1 R1 蛋白促进 α -Syn 的聚集 a 为 α -Syn 在 R1 存在和不存在情况下的聚集曲线;b 为透射电镜观察 R1 纤维、 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 纤维的形态特征

纯的 α -Syn 纤维具有不同的结构,即 R1- α -Syn 复合纤维可能也同样具有不同的诱导聚集的能力。为了验证这个假说,本研究分别将 5 μ g 的 α -Syn 纤维和 R1- α -Syn 复合纤维转入 Syn293 细胞内,发现 R1- α -Syn 复合纤维相对于单纯的 α -Syn 纤维来说能诱导形成更多的 α -Syn 聚集体(图 2)。本研究对不同处理组选取 10 张图片,将包含聚集体的阳性细胞进行统计发现 R1- α -Syn 复合纤维处理组的阳性细胞明显多于 α -Syn 纤维处理组(图 2),即 R1- α -Syn 复合纤维具有更强的致病性。

2.3 R1- α -Syn 复合纤维诱导形成的聚集体具有路易小体的特征

PD 患者脑内聚集的 α -Syn 的第 129 位的丝氨酸发生磷酸化,并与泛素共定位。为了验证 R1- α -Syn 复合纤维诱导的 α -Syn 聚集体是否具有同样的特征,本研究进行免疫荧光实验检测显示,R1- α -Syn 复合纤维诱导的聚集体与 pS129(图 3)和 Ubiquitin (图 4)共定位,即 R1- α -Syn 复合纤维与 α -Syn 纤维

一样具有诱导 α -Syn 形成的聚集体具有类似于路易小体的特点。

3 讨论

随着人口老龄化的加剧,PD 的发病率呈逐年升高的趋势,但 PD 的病因和发病机制并不明确。神经元内路易小体的形成是 PD 特征性的病理变化,其主要组成成分是异常折叠的 α -Syn 聚集体。大量研究发现 α -Syn 聚集体具有朊蛋白样的播散机制,可以诱导可溶性的蛋白形成不溶性蛋白聚集体,从而导致 α -Syn 病变的播散和 PD 的发生^[13]。在小鼠肠道内注射 α -Syn 聚集体不但可以诱导肠道神经内的 α -Syn 聚集,而且可以传播到脑内,诱导出类似 PD 的病理特征^[14]。因此,肠道中 α -Syn 的病理性播散在 PD 的发病和进展过程中起到重要作用。

肠道是人体最容易接触外界微生物的器官之一,目前越来越多的研究表明肠道微生物与 PD 的发病密切相关,肠道微生物菌群紊乱增加了 PD 的

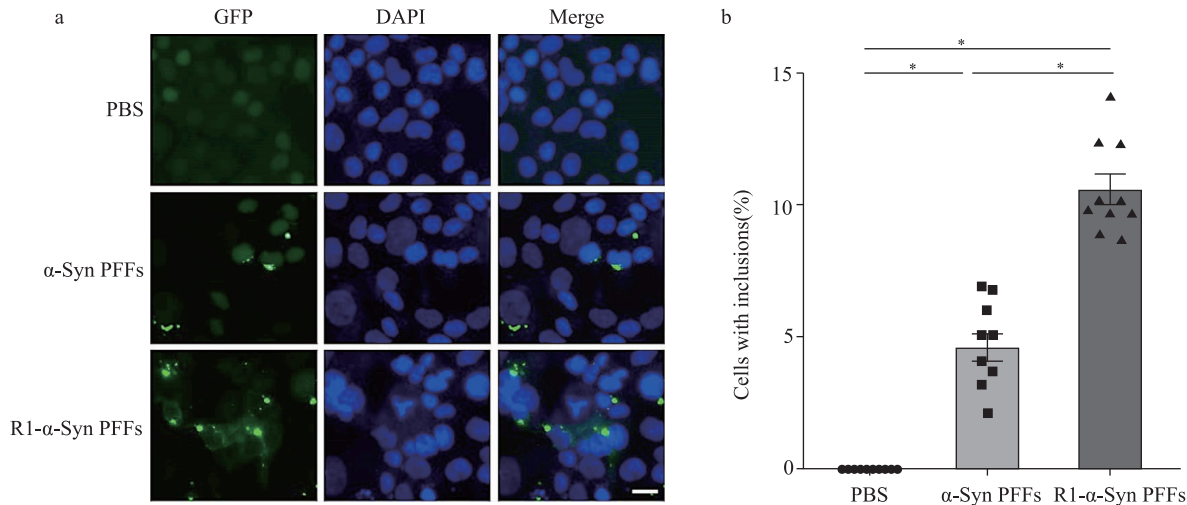


图 2 不同纤维对 Syn293 细胞内 α -Syn 聚集的影响 a 为在显微镜下观察不同纤维诱导 α -Syn 聚集数量,绿色代表 α -Syn 的聚集体,蓝色代表 DAPI(Scare bar = 20 μ m);b 为两两比较, $P < 0.0001$

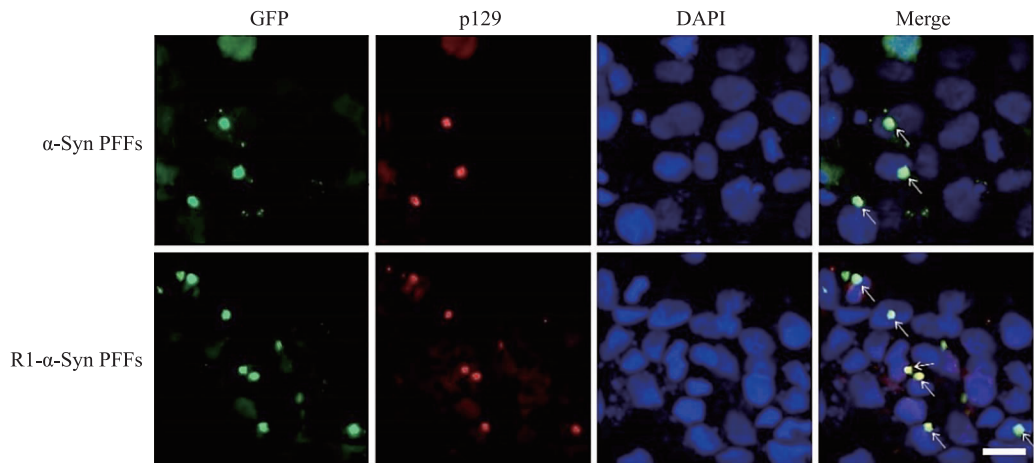


图 3 R1- α -Syn 复合纤维诱导形成的 α -Syn 聚集体发生 pS129 磷酸化

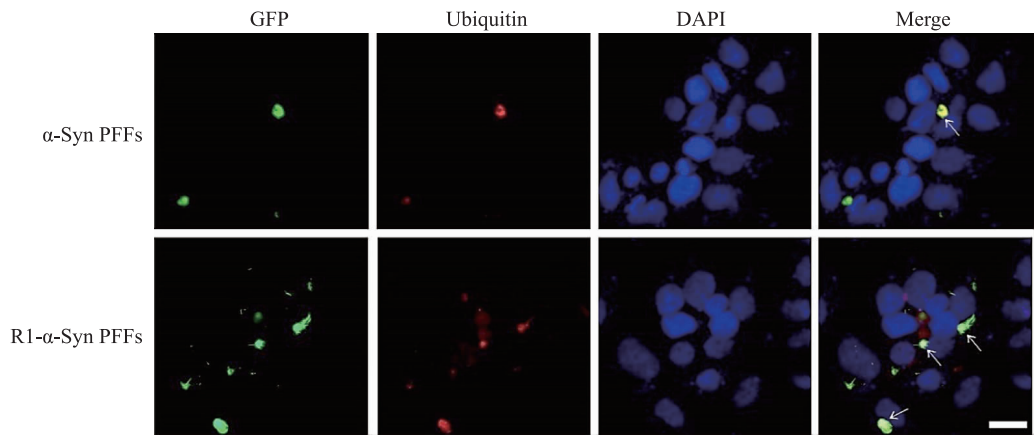


图 4 R1- α -Syn 复合纤维诱导形成的 α -Syn 聚集体与 Ubiquitin 共定位

患病风险,但这些细菌如何导致 PD 发病并不清楚^[15]。早在 2002 年就有研究发现某些细菌可以产生功能性的细胞外淀粉样蛋白,这些蛋白高度保守,参与生物膜的形成,帮助细菌入侵、粘附宿主和抵抗破坏^[16]。Curli 大肠杆菌表面的淀粉样蛋白,其中的 CsgA 亚基含有淀粉样多肽的重复基序^[17]。由于 CsgA 和 α -Syn 均可形成聚集体,本研究发现 CsgA 的 R1 片段可直接促进 α -Syn 的聚集;尤为重要, R1 片段存在的情况下生成的 α -Syn 聚集体具有不同的超微结构,而且在细胞模型中能够诱导 α -Syn 形成更多的细胞内包含体,这些结果提示 R1 片段通过促进 α -Syn 的聚集加速 PD 的进展过程,可以部分解释肠道菌群紊乱导致 α -Syn 的聚集的分子机制:肠道中的 CsgA 的 R1 片段促进 α -Syn 的聚集,聚集的 α -Syn 通过迷走神经等通路进入脑内,导致 PD 的发生。

本研究的意义在于发现了 CsgA 蛋白的 R1 亚基促进 α -Syn 聚集, α -Syn 聚集体形成导致 PD 的发

生,这样将为肠道功能紊乱的 PD 患者的精准治疗提供新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention[J]. Lancet Neurol, 2016, 15(12): 1257-1272.

[2] Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(12): 991-1001.

[3] Simon-Sanchez S, J. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease[J]. Nat Genet, 2009, 41(12): 1308-1312.

[4] Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes parkinson's disease[J]. Science, 2003, 302(5646): 841.

[5] Braak H, Rub U, Gai WP, et al. Idiopathic parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types May be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen[J]. J Neural Transm, 2003, 110(5): 517-536.

- vention[J]. *Drugs Aging*, 2012, 29(2): 105-118.
- [4] Morley JF, Pawlowski SM, Kesari A, et al. Motor and non-motor features of Parkinson's disease that predict persistent drug-induced Parkinsonism[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014, 20(7): 738-742.
 - [5] Tinazzi M, Antonini A, Bovi T, et al. Clinical and [123I]FP-CIT SPET imaging follow-up in patients with drug-induced parkinsonism[J]. *J Neurol*, 2009, 256(6): 910-915.
 - [6] Shin HW, Kim JS, Oh M, et al. Clinical features of drug-induced parkinsonism based on [18F] FP-CIT positron emission tomography[J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(2): 269-274.
 - [7] De GS, Montastruc F, Carvajal A, et al. Drug-induced parkinsonism: Revisiting the epidemiology using the WHO pharmacovigilance database[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, 70: 55-59.
 - [8] Han S, Kim S, Kim H, et al. Prevalence and incidence of Parkinson's disease and drug-induced parkinsonism in Korea [J]. *BMC Public Health*, 2019, 19(1): 1328.
 - [9] Shin HW, Chung SJ. Drug-induced parkinsonism[J]. *J Clin Neurol*, 2012, 8(1):15-21.
 - [10] Bondon-Guitton E, Perez-Lloret S, Bagheri H, et al. Drug-induced parkinsonism: a review of 17 years'experience in a regional pharmacovigilance center in France[J]. *Mov Disord*, 2011, 26(12): 2226-2231.
 - [11] Costa KM. The effects of aging on substantia nigra dopamine neurons[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(46): 15133-15134.
 - [12] Byun JH, Cho H, Kim YJ, et al. Trends in the prevalence of Drug-Induced parkinsonism in Korea[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(8): 760-767.
 - [13] Caligiuri MR, Jeste DV, Lacro JP. Antipsychotic-Induced movement disorders in the elderly: epidemiology and treatment recommendations[J]. *Drugs Aging*, 2000, 17(5): 363-384.
 - [14] Munhoz RP, Bertucci FD, Teive HA. Not all drug-induced parkinsonism are the same: the effect of drug class on motor phenotype[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(2): 319-324.
 - [15] Lim TT, Ahmed A, Itin I, et al. Is 6 months of neuroleptic withdrawal sufficient to distinguish drug-induced parkinsonism from Parkinson's disease? [J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(3): 170-174.
 - [16] Factor SA, Burkhard PR, Caroff S, et al. Recent developments in drug-induced movement disorders: a mixed picture [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(9): 880-890.
 - [17] Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(22): 10993-10997.
 - [18] García Ruiz PJ, Ma MA, Peñafiel N, et al. Cinnarizine-induced parkinsonism in primates [J]. *Clin Neuropharmacol*, 1992, 15(2): 152-154.
 - [19] Meredith GE, Switzer R3, Napier TC. Short-term, D2 receptor blockade induces synaptic degeneration, reduces levels of tyrosine hydroxylase and brain-derived neurotrophic factor, and enhances D2-mediated firing in the ventral pallidum[J]. *Brain Res*, 2004, 995(1): 14-22.
 - [20] Fà M, Mereu G, Ghiglieri V, et al. Electrophysiological and pharmacological characteristics of nigral dopaminergic neurons in the conscious, head-restrained rat[J]. *Synapse*, 2003, 48(1): 1-9.
 - [21] Iwahashi K, Anemo K, Nakamura K, et al. Analysis of the metabolism of haloperidol and its neurotoxic pyridinium metabolite in patients with drug-induced parkinsonism[J]. *Neuropsychobiology*, 2001, 44(3): 126-128.
 - [22] Fereshtehnejad SM, Dawson BK, Pelletier A, et al. Long lag between drug-induced parkinsonism and idiopathic parkinson's disease in idiopathic REM sleep behavior disorder[J]. *Mov Disord Clin Pract*, 2018, 5(2): 203-205.
 - [23] Honer WG, Kopala LC, Rabinowitz J. Extrapyramidal symptoms and signs in first-episode, antipsychotic exposed and non-exposed patients with schizophrenia or related psychotic illness [J]. *J Psychopharmacol*, 2005, 19(3): 277-285.
 - [24] Olivares RJ, Arjona PA, Barrero HF, et al. Utility of transcranial sonography in the diagnosis of drug-induced parkinsonism: a prospective study[J]. *European Journal of Neurology*, 2013, 20(11): 1451-1458.
 - [25] Lee PH, Kim JS, Shin DH, et al. Cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with drug induced parkinsonism[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77(3): 372-374.

(2022-03-13 收稿)

(上接第 404 页)

- [6] Verbaan D, Marinus J, Visser M, et al. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease[J]. *Neurology*, 2007, 69(4): 333-341.
- [7] Colosimo C. Nonmotor presentations of multiple system atrophy[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(5): 295-298.
- [8] Engen P, Dodiya HB, Naqib A, et al. The potential role of Gut-Derived inflammation in multiple system atrophy [J]. *J Parkinsons Dis*, 2017, 7(2): 331-346.
- [9] Sakakibara R, Doi H, Fukudo S. Lewy body constipation[J]. *J Anus Rectum Colon*, 2019, 3(1): 10-17.
- [10] Woerman AL, Stöhr J, Aoyagi A, et al. Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(35): E4949-E4958.
- [11] Sampson, R T. A gut bacterial amyloid promotes alpha-synuclein aggregation and motor impairment in mice[Z],2020.
- [12] Volpicelli-Daley LA, Lee VM. Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(9): 2135-2146.
- [13] Luk KC, Kehm V, Carroll J, et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in non-transgenic mice[J]. *Science*, 2012, 338(619): 949-953.
- [14] Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats[J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(6): 805-820.
- [15] Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease[Z],2017:1-7.
- [16] Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, et al. Role of escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation [J]. *Science*, 2002, 295(5556): 851-855.
- [17] Wang XD, Chapman MR. The molecular basis of functional bacterial amyloid polymerization and nucleation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(31): 21530-21539.

(2022-01-12 收稿)