

二价铜离子对人胰岛淀粉样蛋白(hIAPP) (11~28)多肽聚集的影响

陆澄^a 李琳^a 鄢鹏^a 张楠^a 陈武超^a 张公军^b 周星飞^{a*}

(^a宁波大学理学院 浙江 宁波 315211; ^b中国科学院宁波材料技术与工程材料所 浙江 宁波 315211)

摘要 人胰岛淀粉样蛋白(hIAPP)与Ⅱ型糖尿病(T2DM)密切相关,被认为是导致胰岛 β 细胞凋亡的致病因素之一,研究发现环境因素(如金属离子、pH值和温度等)对hIAPP的聚集过程有很大影响。本文采用多种生物物理的实验方法,研究了二价铜离子对hIAPP及其片段聚集的影响。原子力显微镜(AFM)和硫代黄素T(ThT)荧光的测量表明,铜离子能够明显地抑制hIAPP(11~28)聚集成纤维,其抑制程度随铜离子浓度的增加而明显加剧。显微傅里叶变换红外光谱(Micro-FTIR)的结果表明,铜离子能够抑制hIAPP多肽中 α 螺旋结构向 β 折叠的转变。另外,氨基酸定点突变实验结果表明,hIAPP(11~28)中的组氨酸(His18)可能对多肽的聚集行为和金属铜离子的相互作用起到了决定性的影响。

关键词 铜离子;人胰岛淀粉样蛋白;Ⅱ型糖尿病

中图分类号:O647.9;O469;Q518.1

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2018)02-0147-07

DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2018.02.170378

淀粉样多肽的错误折叠(即从蛋白单体到纤维的形成)与许多退行性疾病有关,如Ⅱ型糖尿病(T2DM)、阿尔茨海默氏病(AD)和帕金森氏病(PD)^[1-4]。T2DM是一种常见的糖尿病,通常认为它的发病与人胰岛淀粉样多肽(hIAPP,也称为人胰淀素)的聚集有密切关系,高达90%的T2DM患者的胰岛 β 细胞中存在这种淀粉样沉积^[5],这与老年痴呆症中特征性 β 折叠的淀粉样蛋白聚集很类似^[6-7]。hIAPP是由37个残基组成的多肽,从可溶性的 α 螺旋/无规卷曲到不溶性的 β 折叠构象的异常转变就有可能产生 β 细胞毒性^[8-10],导致胰岛 β 细胞功能障碍和死亡。研究表明,淀粉样多肽的聚集不仅与氨基酸种类和序列密切相关,还与非遗传因素有关。例如,金属离子、pH值、纳米颗粒、温度和空间约束等^[11-13]。

铜是人体内普遍存在的一种微量元素,成人每天需摄入1~3 mg,正常条件下人脑中自由铜离子浓度非常低,对神经功能的影响并不显著性。但是T2DM和帕金森症等一些神经退行性疾病的病人体内的铜离子浓度比正常人高一个数量级^[14-15]。健康人血浆铜离子浓度为 $(13.08 \pm 2.53) \mu\text{mol/L}$,糖尿病患者或者阿尔茨海默病患者的A β 斑块中铜离子浓度高达 $400 \mu\text{mol/L}$ ^[16],因此我们选择3种铜离子浓度(10、50和 $100 \mu\text{mol/L}$)来研究其对多肽聚集的影响。目前研究表明,铜离子和hIAPP相互作用改变了多肽的聚集途径和聚集产物^[17-18]。鉴于hIAPP不同种类的氨基酸对铜离子的作用不同^[19],我们合成了不同序列的3个肽片段,分别是hIAPP(1~11)、hIAPP(11~28)和hIAPP(28~37)。利用原子力显微镜(AFM)和硫代黄素T(ThT)荧光研究了3种hIAPP片段的纤维化趋势及金属铜离子对其聚集的作用。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Nanoscope V型原子力显微镜(AFM,德国Bruker公司);Fluoroskan Ascent型标准型荧光光谱仪(美

2017-10-23 收稿,2017-11-29 修回,2017-12-18 接受

国家自然科学基金(11474173)和浙江省自然科学基金(LY18A040003)资助

通讯联系人:周星飞,研究员;Tel/Fax:0574-87600744;E-mail:zhouxingfei@nbu.edu.cn;研究方向:生物物理

国 Thermo Scientific 公司); Cary660 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR, 美国 Agilent 公司)。

hIAPP 购于美国 AnaSpec 公司, 纯度 $\geq 96\%$; hIAPP(1~11)、hIAPP(11~28) 和 hIAPP(28~37) 购于上海强耀生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98.47\%$; hIAPP(H18R) 和 hIAPP(H18S) 购于上海吉尔生化有限公司, 纯度 $\geq 98.76\%$; 氯化铜和硫代黄素 T (ThT) 荧光购于上海 Sigma-Aldrich 公司。磷酸盐缓冲液 (PBS, 磷酸氢二钠 8 mmol/L、氯化钠 136 mmol/L、磷酸二氢钾 2 mmol/L、氯化钾 2.6 mmol/L, pH 值 ~ 7.4) 购于国药化学试剂有限公司。实验用水为 Milli-Q 水, 其电导率为 18.2 M Ω /cm。为了制备新鲜的肽溶液, 首先将 1 mg hIAPP 以及各种多肽片段溶解在超纯水 (18.2 M Ω /cm) 中, 配制浓度为 4 mmol/L 的储存溶液, 保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 使用前用 PBS 稀释至所需浓度。将 ThT 荧光试剂用超纯水稀释成浓度 4 mmol/L 的溶液, 保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验时将储存的 ThT 试剂稀释为终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 AFM 观察

首先, 用 PBS 稀释 hIAPP 以及各种不同序列的片段短肽储存溶液, 与不同浓度的铜离子混合, 使多肽的最终浓度均为 100 $\mu\text{mol/L}$, 然后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 3 d。接着, 将 4~5 μL 培养过的样品滴加在新解离的云母片上, 吸附 3 min 后在室温下自然晾干, 用于 AFM 观察, 实验中 AFM 在空气中采用轻敲模式观察样品的表面形貌^[20]。AFM 使用的探针型号为 NSC11 (三角形悬臂, 爱沙尼亚 MikroMash 公司), 其典型共振频率为 330 kHz, 典型弹性常数为 50 N/m, 扫描速率为 1 Hz。实验数据使用 NanoScope V1.20 软件分析。

1.3 ThT 荧光方法

为了研究 hIAPP 和金属铜离子相互作用的动力学性质, 将 hIAPP(11~28) 溶液分别加入 ThT 荧光分子和不同浓度的 CuCl_2 , 使多肽和 ThT 的终浓度分别为 100 和 50 $\mu\text{mol/L}$, 铜离子的浓度分别是 0、10、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。这些样品被滴加到无盖平底 96 孔板 (美国 Corning 公司 3925 型多孔板) 中进行荧光测量。每个样品重复 3 次, 每 5 min 采集 1 次荧光数据。实验中, 所采用的荧光光谱仪的激发波长和发射波长分别为 440 和 485 nm。

1.4 Micro-FTIR 光谱方法

对于 Micro-FTIR 测量, 分辨率为 0.4 cm^{-1} , 所需样品制备与上述 AFM 实验相同。hIAPP(11~28) (终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$) 分别和两种不同浓度的铜离子混合 (10 和 100 $\mu\text{mol/L}$), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。在金刚石样品台表面滴加 2~3 μL 的多肽溶液, 然后用红外线灯烘干。FTIR 分析的数据集中在酰胺 I 模式, 这是肽二级结构的一个的重要指标^[21-22]。

2 结果与讨论

2.1 hIAPP 不同片段的聚集行为

图 1A 是 hIAPP 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下不加金属铜离子时培养 3 d 的 AFM 图, 我们可以观察到绝大部分 hIAPP 单体均聚集成为了很长的纤维 (平均长度约为 $(2.53 \pm 0.69)\text{ }\mu\text{m}$, 纤维统计数目为 70 根)。图 1B~1D 是 3 种不同短肽, 即 hIAPP(11~28)、hIAPP(1~11) 和 hIAPP(28~37) 在相同实验条件下聚集的形貌图。在 3 种肽片段中, 只有 hIAPP(11~28) 能够形成纤维状聚集体, 绝大部分蛋白单体聚集成为了纤维, 其长度大约是 $(1.81 \pm 0.47)\text{ }\mu\text{m}$, 而 hIAPP(1~11) 和 hIAPP(28~37) 大部分形成了颗粒状的聚集体。说明只有全序列的 hIAPP 和 hIAPP(11~28) 片段具有很强的聚集能力, 而 hIAPP(1~11) 和 hIAPP(28~37) 不具有聚集行为。因此, 实验结果表明 hIAPP(11~28) 片段是 hIAPP 多肽聚集的核心区域^[23]。

2.2 铜离子对 hIAPP 聚集行为的影响

用 AFM 研究了不同浓度的铜离子对 hIAPP(11~28) 聚集的影响。通过 AFM 的轻敲模式获得沉积在云母衬底上的样品的形貌。hIAPP(11~28) 与不同浓度的铜离子与 hIAPP(11~28) 共同培养时, 其聚集行为被明显抑制了。当铜离子的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 的短纤维形成了, 如图 2A 所示, 其长度大约是 $(0.61 \pm 0.20)\text{ }\mu\text{m}$; 随着铜离子浓度的增加, 形成的纤维长度进一步缩短到 $(0.39 \pm 0.08)\text{ }\mu\text{m}$; 当铜离子浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 几乎观察不到纤维的形成, 只有大块的颗粒状聚集体, 说明铜离子可以很有效地抑制 hIAPP(11~28) 的纤维化。

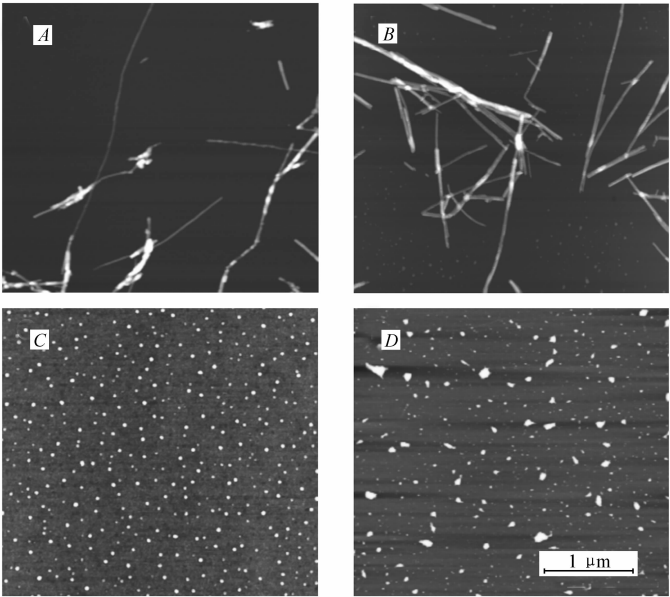


图 1 4 种不同序列的肽片段在 37 ℃ 环境下培养 3 d 后的 AFM 图像

Fig. 1 AFM images of four peptide fragments incubated at 37 ℃ for three days

A. hIAPP(1~37); B. hIAPP(11~28); C. hIAPP(1~11); D. hIAPP(28~37)

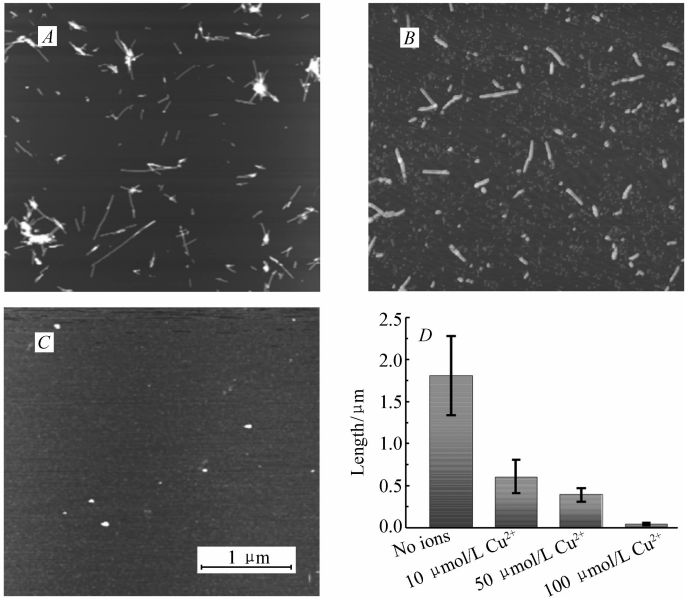


图 2 铜离子对 hIAPP(11~28)纤维化的影响。A~C 是 hIAPP (11~28) 分别与不同浓度的氯化铜混合培养 3 d 后的 AFM 形貌及纤维长度统计图

Fig. 2 AFM images of hIAPP(11~28) incubated at 37 ℃ for three days in the presence of copper ions at different concentrations(A~C), and the statistical diagram (D) of lengths of hIAPP(11~28) aggregation incubated with copper ions at different concentration

$c(\text{Cu}^{2+})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$:A. 10; B. 50; C. 100

为了进一步研究铜离子影响 hIAPP(11~28)聚集的动力学过程,利用 ThT 荧光光谱对 hIAPP(11~28)的聚集过程进行监测。ThT 荧光是用于检测与蛋白质错误折叠相关的淀粉样多肽纤维化的常用方法,其原理是 ThT 荧光分子可以与蛋白纤维中的 β 片层结构特异性结合,并在波长 482 nm 附近产生新

的发射峰^[24-25]。

如图 3 所示,对于未引入铜离子的 hIAPP(11 ~ 28),ThT 荧光曲线由初始的滞后期、快速生长期和具有最大荧光强度的最终平稳期 3 个阶段组成,这与文献报道的数据一致^[26]。由图 3 可知,在 hIAPP(11 ~ 28)溶液中加入不同浓度的铜离子后,ThT 荧光强度变弱了。当加入的铜离子浓度较低时(10 和 50 $\mu\text{mol/L}$),尽管在整个实验过程中我们还是能够观察到典型的多肽聚集的三阶段曲线,但荧光强度明显减弱了,说明铜离子抑制了 hIAPP(11 ~ 28)的聚集。这与我们之前 AFM 的观察结果是吻合的。当铜离子浓度增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,几乎观察不到 ThT 荧光的变化,即使经过几天的培养后,ThT 荧光强度也很弱,说明引入高浓度的铜离子后多肽的折叠路径完全改变了^[27]。

进一步利用显微 FTIR (Micro-FTIR) 来揭示淀粉样多肽纤维化过程的构象变化, Micro-FTIR 是一种可以提供关于酰胺 I 带(1600 ~ 1700 cm^{-1})和酰胺 III 带(1220 ~ 1330 cm^{-1})分子结构信息的光谱技术,酰胺带的不同频率与蛋白质的二级结构成分有密切的关系。

使用 Micro-FTIR 监测在铜离子缺失和存在情况下的 hIAPP(11 ~ 28)的二级结构。图 4 为加入和未加入铜离子的 hIAPP(11 ~ 28)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d 后典型的 Micro-FTIR 光谱。对于不加铜离子的 hIAPP(11 ~ 28),仅在 1629 cm^{-1} 附近出现一个波峰,对应于典型的 β -折叠结构^[28],这意味着 hIAPP(11 ~ 28)聚集形成纤维的二级结构以 β 折叠为主。相比之下,当引入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的铜离子后,在 1652 cm^{-1} 附近出现了一个小肩峰,这个峰可以归因于无规卷曲或螺旋结构^[29]。实验结果表明,当引入较低浓度的铜离子时,hIAPP(11 ~ 28)聚集体的二级结构主要为 β -折叠和 α -螺旋共存。随着铜离子浓度进一步增加至 100 $\mu\text{mol/L}$,在 1629 cm^{-1} 处的吸收峰强度急剧下降,说明聚集体中 β 折叠结构明显减少,主要是以 α -螺旋结构存在。这些结果表明,hIAPP(11 ~ 28)的聚集在铜离子存在下受到明显的抑制。

2.3 hIAPP 中组氨酸的重要作用

Carolina 等^[30]曾利用固体核磁共振实验,发现铜离子能够和 hIAPP 中的组氨酸(His18)有很强的相互作用。实验中发现铜离子能够抑制 hIAPP(11 ~ 28)的聚集,这很可能是因为片段中的(His18)和铜离子结合影响了其局域的结构^[31],进而影响了 hIAPP(11 ~ 28)的聚集行为。为了验证这一猜想,将 His18 分别突变成丝氨酸(Ser)和精氨酸(Arg),将这个 2 个突变后的样品 hIAPP(H18S)和 hIAPP(H18R)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d,发现组氨酸被丝氨酸替换后出现了图 5A 所示的短棒状聚集,其长度大约是(0.28 \pm 0.02) μm ,明显比 hIAPP(11 ~ 28)形成的纤维(长度为(1.81 \pm 0.47) μm)要短,说明这种 hIAPP(H18S)突变体聚集能力明显下降。当组氨酸被精氨酸替换后,只观察到颗粒状和块状的聚集体,而且数量较少(图 5B)。以上实验说明,His18 在 hIAPP

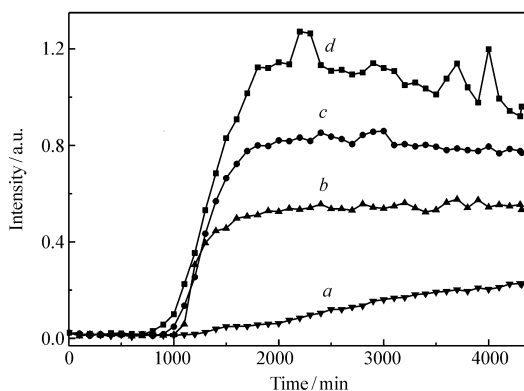


图 3 ThT 荧光光谱检测铜离子影响 hIAPP(11 ~ 28)聚集过程

Fig. 3 Kinetic analysis of hIAPP (11 ~ 28) fibril formation monitored by ThT fluorescence in the absence and presence of different concentration Cu^{2+}

$c(\text{Cu}^{2+})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a. 100; b. 50; c. 10; d. 0

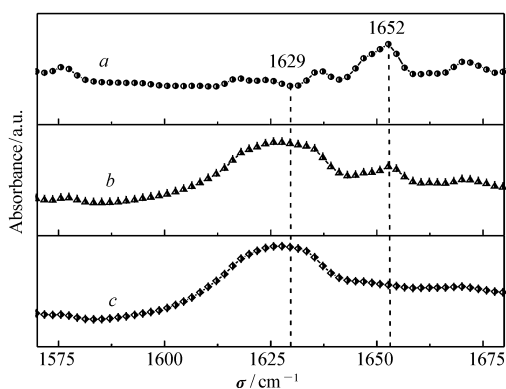


图 4 hIAPP(11 ~ 28)在加入不同浓度的铜离子后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 d 后的 Micro-FTIR 图

Fig. 4 Micro-FTIR spectra of hIAPP (11 ~ 28) incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for three days in the absence or in the presence of Cu^{2+} ions at different concentrations

$c(\text{Cu}^{2+})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a. 100; b. 10; c. 0

(11~28)的聚集中起到很大的作用。当其与铜离子结合后很可能改变了局域的分子结构,从而抑制了多肽的聚集。

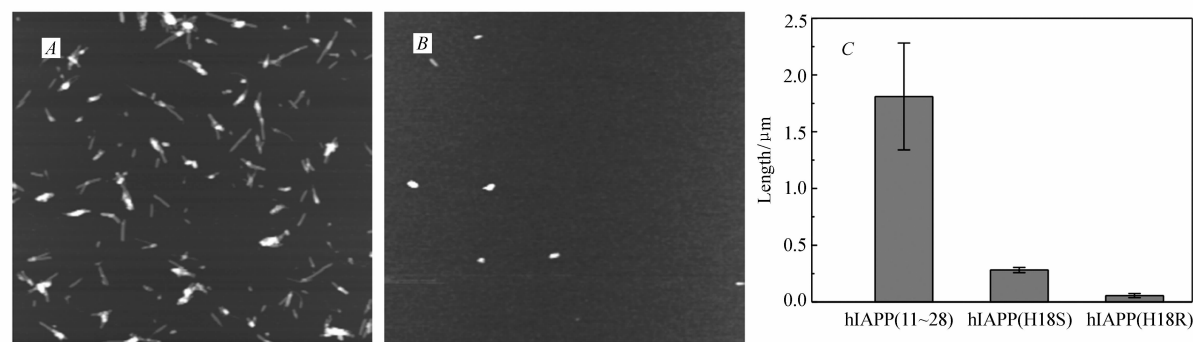


图 5 hIAPP(H18S)(A)和hIAPP(H18R)(B)氨基酸突变后的肽片段在37℃环境下培养3d后的AFM图像及纤维长度统计图(C)

Fig. 5 AFM images of hIAPP(H18S)(A) and hIAPP(H18R)(B) peptide fragments incubated at 37℃ for three days, and the statistical diagram(C) of lengths for 3 peptide fragments

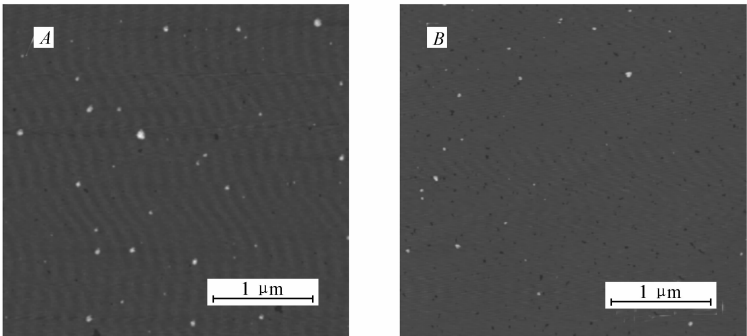


图 6 hIAPP(H18S)(A)和hIAPP(H18R)(B)氨基酸突变后的肽片段在37℃环境下与50μmol/L氯化铜混合培养3d后的AFM形貌

Fig. 6 AFM images of hIAPP(H18S)(A) and hIAPP(H18R)(B) peptide fragments incubated at 37℃ for three days in the presence of 50 μmol/L CuCl₂

3 结 论

人胰岛淀粉样多肽(hIAPP)是和Ⅱ型糖尿病密切相关的一类淀粉样多肽,而金属离子对淀粉样多肽的聚集有很大的影响。初步研究了铜离子和hIAPP的相互作用,原子力显微镜和硫代黄素(ThT)荧光的结果表明铜离子能够抑制多肽的聚集,其抑制程度和铜离子的浓度密切相关,而且,铜离子能够明显改变hIAPP多肽的聚集途径以及聚集体的二级结构。铜离子能够抑制hIAPP(11~28)多肽的聚集很可能是与组氨酸(His18)结合,改变了多肽的局域结构。通过这个研究将有助于更加深入地了解铜离子与hIAPP(11~28)的相互作用,并对Ⅱ型糖尿病的起因有新的理解。

参 考 文 献

[1] Ashraf G M, Greig N H, Khan T A, et al. Protein Misfolding and Aggregation in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *CNS Neurol Disord-Dr*, 2014, **13**(7): 1280-1293.

[2] Detoma A S, Salamekh S, Ramamoorthy A, et al. Misfolded Proteins in Alzheimer's Disease and Type II Diabetes[J]. *Chem Soc Rev*, 2011, **41**(2): 608-621.

[3] WANG Chengke, WANG Zhenxin. Screening of Cu(Ⅱ) Ion Induced β -Amyloid Peptide Aggregation Inhibitor and Their Molecular Structure Analysis[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2016, **33**(7): 834-840 (in Chinese).

王承克,王振新. Cu(Ⅱ)离子诱导的 β -淀粉样蛋白聚集抑制剂筛选及分子构效关系分析[J]. *应用化学*, 2016, **33**

- (7):834-840.
- [4] LV Xiaoping, TAN Xiangshi. Metals Homeostasis and Related Proteins in Alzheimer's Disease[J]. *Prog Chem*, 2013, **25**(4):511-519 (in Chinese).
吕小平, 谭相石. 阿尔茨海默病相关的金属内稳态平衡调控研究[J]. *化学进展*, 2013, **25**(4):511-519.
- [5] Association A D. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2010, **33**(Suppl 1):s62-s69.
- [6] Chimon S, Shaibat M A, Jones C R, *et al.* Evidence of Fibril-Like Beta-Sheet Structures in a Neurotoxic Amyloid Intermediate of Alzheimer's Beta-Amyloid[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**:1157-1164.
- [7] Hardy J, Selkoe D J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics [J]. *Science*, 2002, **297**(5580):353-356.
- [8] Konarkowska B, Aitken J F, Kistler J, *et al.* The Aggregation Potential of Human Amylin Determines Its Cytotoxicity Towards Islet β -Cells[J]. *FEBS J*, 2006, **273**(15):3614-3624.
- [9] Cooper G J, Willis A C, Clark A, *et al.* Purification and Characterization of a Peptide from Amyloid-Rich Pancreases of Type 2 Diabetic Patients[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, **84**(23):8628-8632.
- [10] Zraika S, Hull R L, Udayasankar J, *et al.* Oxidative Stress is Induced by Islet Amyloid Formation and Time-Dependently Mediates Amyloid-Induced Beta Cell Apoptosis[J]. *Diabetologia*, 2009, **52**(4):626-635.
- [11] ZHANG Yong, ZHU Junmiao, LIU Changlin. Cu^{2+} and Zn^{2+} -induced Aggregation of Amyloid- β Peptide[J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, **47**(3):399-404 (in Chinese).
张勇, 竹俊苗, 刘长林. 金属离子 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 诱导 β -淀粉样蛋白的聚集[J]. *药学学报*, 2012, **47**(3):399-404.
- [12] Malisauskas M, Zamotin V, Jass J, *et al.* Amyloid Protofilaments from the Calcium-binding Protein Equine Lysozyme: Formation of Ring and Linear Structures Depends on pH and Metal Ion Concentration[J]. *J Mol Biol*, 2003, **330**(4):879-890.
- [13] CUI Chengyi, ZHANG Jinhai, ZHOU Xingfei. Temperature Effects on Growth of Glucagon Fibers[J]. *Nucl Sci Tech*, 2008, **31**(11):877-880 (in Chinese).
崔成毅, 张金海, 周星飞. 温度对胰高血糖素纤维生长的影响[J]. *核技术*, 2008, **31**(11):877-880.
- [14] Bush A I. The Metallobiology of Alzheimer's Disease[J]. *Trends Neurosci*, 2003, **26**(4):207-214.
- [15] Zargar A H, Bashir M I, Khan A R, *et al.* Copper, Zinc and Magnesium Levels in Fibrocalculous Pancreatic Diabetes[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2000, **108**:397-400.
- [16] Smith D, Ciccotosto G D, Fodero-Tavoletti M, *et al.* Concentration Dependent Cu^{2+} Induced Aggregation and Dityrosine Formation of the Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptide[J]. *Biochemistry*, 2007, **46**:2881-2891.
- [17] Masad A, Hayes L, Tabner B J, *et al.* Copper-mediated Formation of Hydrogen Peroxide from the Amylin Peptide: A Novel Mechanism for Degeneration of Islet Cells in Type-2 Diabetes Mellitus? [J]. *FEBS Lett*, 2007, **581**(18):3489-3493.
- [18] Magri A, La M D, Nicoletti V G, *et al.* New Insight in Copper-Ion Binding to Human Islet Amyloid: The Contribution of Metal-Complex Speciation to Reveal the Polypeptide Toxicity[J]. *Chemistry*, 2016, **22**(37):13287-13300.
- [19] Sinopoli A, Magri A, Milardi D, *et al.* The Role of Copper(II) in the Aggregation of Human Amylin[J]. *Metallomics*, 2014, **6**(10):1841-1852.
- [20] LI Hongying, GU Ningyu, TANG Jilin. Application of Atomic Force Microscopy Based Single Molecule Force Spectroscopy in Biological Research [J]. *Chinese J Appl Chem*, 2012, **29**(12):1356-1363 (in Chinese).
黎虹颖, 古宁宇, 唐纪琳. 基于原子力显微镜的单分子力谱在生物研究中的应用[J]. *应用化学*, 2012, **29**(12):1356-1363.
- [21] Haris P I, Chapman D. Analysis of Polypeptide and Protein Structures Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy[J]. *Methods Mol Biol*, 1994, **22**:183-202.
- [22] DONG Yanming, WANG Mian, WU Yusong. Determination of Degree of Substitution for Phthaloyl Chitosan by FTIR[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2001, **18**(4):259-263 (in Chinese).
董炎明, 王勉, 吴玉松. 用 FTIR 测定邻苯二甲酰化壳聚糖的取代度[J]. *应用化学*, 2001, **18**(4):259-263.
- [23] Qi R, Luo Y, Ma B, *et al.* Conformational Distribution and α -Helix to β -Sheet Transition of Human Amylin Fragment Dimer [J]. *Biomacromolecules*, 2014, **15**(1):122-131.
- [24] Robbins K J, Liu G, Selmani V, *et al.* Conformational Analysis of Thioflavin T Bound to the Surface of Amyloid Fibrils[J]. *Langmuir*, 2012, **28**(48):16490-16495.
- [25] Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, *et al.* Mechanism of Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils[J]. *J Struct Biol*, 2005, **151**(3):229-238.
- [26] Faller P, Hureau C, Berthoumieu O. Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer's Amyloid- β Peptide[J]. *Inorg Chem*, 2013, **52**:12193-12206.
- [27] Suzuki K, Miura T, Takeuchi H. Inhibitory Effect of Copper(II) on Zinc(II)-induced Aggregation of Amyloid-beta Peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**(4):991-996.

- [28] Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert J M. Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy[J]. *Subcell Biochem*,1994,**23**:329-362.
- [29] Kong J, Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*,2007,**39**(8):549-559.
- [30] Sánchezlópez C, Cortésmejía R, Miotto M C, *et al.* Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide[J]. *Inorg Chem*,2016,**55**:10727-10740.
- [31] Rivillasacedo L, Amero C, Quintanar L. Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes[J]. *Inorg Chem*,2015,**54**(8):3788-3796.

Effect of Copper Ions on the Aggregation of Human Islet Amyloid Polypeptide(11~28)

LU Cheng^a, LI Lin^a, YAN Peng^a, ZHANG Nan^a, CHEN Wuchao^a, ZHANG Gongjun^b, ZHOU Xingfei^{a*}

(^a*School of Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China*;

^b*Ningbo Institute of Material Technology and Engineering,*

Chinese Academy of Sciences, Ningbo, Zhejiang 315201, China)

Abstract Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is closely associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM), which is one of possible pathogenic factors of islet beta cell apoptosis. It has been suggested that the environmental factors (such as metal ions, pH and temperature) have great effects on the aggregation process of hIAPP. In this study, we investigate the influence of copper(II) ions on the aggregation of hIAPP and its fragments by a variety of biophysical methods. Atomic force microscope (AFM) and thioflavin T (ThT) fluorescence measurements show that the copper ions can inhibit hIAPP(1~37) and hIAPP(11~28) to aggregate into fibers. In addition, the micro-Fourier transform infrared spectroscopy (Micro-FTIR) shows that copper ions can restrain the transition from alpha helices structure to beta sheets formation during the peptide incubation. By the single amino acid mutation experiment, we speculate that the His18 in hIAPP(11~28) may have a dominant effect on the aggregation behavior and the interaction with copper ions.

Keywords copper(II) ions; human islet amyloid protein; type 2 diabetes

Received 2017-10-23; Revised 2017-11-29; Accepted 2017-12-18

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 11474173), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. LY18A040003).

Corresponding author: ZHOU Xingfei, professor; Tel/Fax: 0574-87600744; E-mail: zhouxingfei@nbu.edu.cn; Research interests: biophysics