

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：LC3B 结合化合物 PAZ 调控自噬的机制及其应用

姓 名：柴佩含 学 号：20307110356

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：付玉华 职 称：副研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2024 年 5 月 20 日

LC3B 结合化合物 PAZ 调控自噬的 机制及其应用

完成人

柴佩含

指导小组成员

付玉华 副研究员

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1.1 选题的目的和意义.....	2
1.2 研究综述.....	2
1.2.1 自噬与 LC3 蛋白.....	2
1.2.2 自噬途径的调控.....	3
1.2.3 利用 LC3B 结合化合物调控自噬.....	3
1.2.4 亨廷顿病简介.....	4
1.2.5 脊髓小脑共济失调 1 型简介.....	4
1.3 研究内容与思路.....	4
二、材料与方法.....	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 细胞与组织样品.....	5
2.1.2 抗体.....	5
2.2 实验耗材、仪器与软件.....	5
2.3 实验软件.....	8
2.4 实验方法.....	8
2.4.1 细胞转染.....	8
2.4.2 Western Blot.....	8
2.4.3 免疫荧光技术.....	9

2.4.4 质粒构建.....	9
2.4.5 BioID.....	10
2.4.6 神经元的分化.....	11
2.4.7 数据分析与制图.....	11
三、研究结果.....	12
3.1 PAZ 提高自噬水平.....	12
3.2 PAZ 促进自噬流.....	12
3.3 PAZ 对自噬的作用不依赖于泛素化修饰系统和溶酶体生物发生.....	13
3.4 PAZ 对自噬的作用不依赖于 ATG4A 和 ATG4B.....	13
3.5 PAZ 影响自噬流介导的关键蛋白筛选.....	13
3.6 PAZ 在小鼠神经前体细胞中减少 ATXN1 聚集.....	14
3.7 PAZ 在 HD 患者成纤维细胞和人源 iPSC 分化神经元中具有挽救作用....	15
四、讨 论.....	17
参考文献	18
致谢	21

摘要

自噬是细胞将其成分转运到溶酶体降解的过程，其功能障碍可导致神经退行性疾病等。目前，已有调控自噬的化合物诸如雷帕霉素等，但这些化合物并非直接靶向自噬机器，其作用靶点特异性不高，因而存在潜在风险，所以特异高效靶向调控自噬的化合物有待进一步筛选和研究。LC3B 是自噬体脂膜融合和体积扩张的关键蛋白，如果能够筛选到特异性结合 LC3B 的化合物，就有望特异地调节自噬水平，从而应用于神经退行性疾病中致病蛋白的降解。在前期筛选的基础上，本研究使用免疫荧光染色、蛋白免疫印迹等方法证实 LC3B 结合化合物 PAZ 能够促进自噬流，且不依赖于自噬调节蛋白酶 ATG4，也不改变全局性泛素化修饰和溶酶体的生物发生，并使用 BioID 和质谱分析的方法进一步筛选出 PAZ 可能介导的关键蛋白。最后在小鼠神经前体细胞中发现 PAZ 能够降低野生型和突变型 ATXN1 的聚集，且在亨廷顿病患者的成纤维细胞和人源 iPSC 分化神经元中能够促进自噬，并对退行性神经元具有挽救作用。本文首次发现 LC3B 结合化合物 PAZ 对自噬水平的特异性整体性提高效果，该药物有望在神经退行性疾病致病蛋白的降解领域有重要应用。

关键词： 神经退行性疾病，自噬流，化合物，神经元

Abstract

Autophagy is the process by which cells transport their components to lysosome for degradation, and its dysfunction can lead to neurodegenerative diseases and so on. At present, there are compounds that can regulate autophagy, such as Rapamycin. However, these compounds do not directly target autophagy machines, so their target specificity is poor, leading to potential risks. Therefore, specific and efficient compounds that regulate autophagy need to be further screened and studied. LC3B is a key protein in the fusion and volume expansion of autophagosome lipid membranes. If compounds that specifically bind LC3B can be screened, it is expected that autophagy levels can be specifically regulated, so as to be applied to the degradation of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. On the basis of previous screening, this study confirmed that LC3B binding compound PAZ can promote autophagy flow without dependence on autophagy regulatory protease ATG4, and does not change global ubiquitination modification or lysosome biogenesis by using immunofluorescence and western blot. The key proteins mediated by PAZ were further screened by BioID and mass spectrometry. Finally, PAZ was found to reduce the accumulation of wild-type and mutant ATXN1 in mouse neural precursor cells, promote autophagy in fibroblasts and human iPSC-derived neurons of Huntington's disease patients, and save degenerative neurons. In this paper, LC3B binding compound PAZ has been found for the first time to enhance the specific overall effect of autophagy level, which is expected to have important applications in the field of degradation of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases.

Key words: Neurodegenerative diseases, autophagy flux, compounds, neurons

一、前言

1.1 选题的目的和意义

自噬是指需要降解的蛋白质和细胞器等组分被包裹,并最终送至溶酶体被降解的过程,在细胞废物清除、结构重建、生长发育中作用重大,而其功能紊乱则会导致神经退行性疾病^[1, 2]、癌症^[3, 4]、代谢紊乱^[5]、衰老加速^[6]和炎症发生^[7]等。Ohsumi 在酵母模中解析完成自噬的关键机制^[8],然而自噬的精细调控机制仍有待研究。基于自噬机制通过生化手段干预自噬途径,不仅可以进一步探究自噬机制,而且能够拓展自噬在疾病研究和治疗中的应用。目前,已有调控自噬的化合物诸如雷帕霉素(Rapamycin)、Lithium、Sodium valproate、Carbamazepine 及其它小分子 (Trehalose、Trifluoperazine、Penitrem A)^[9]等,但这些化合物并非直接靶向自噬机器,其作用靶点特异性不高,因而存在潜在风险,所以特异高效靶向调控自噬的化合物有待进一步筛选和研究。LC3B 是自噬体的特异蛋白,为衡量自噬的关键指标,研究 LC3B 的结合化合物调控自噬的机制有巨大前景。经过前期的无偏向化合物微阵列的高通量筛选得到 LC3B 结合化合物 PAZ (帕唑帕尼),初步实验表明该化合物可以特异性靶向自噬机器,促进自噬体和溶酶体融合从而提高自噬水平,但其机制和功能尚需进一步探究。

1.2 研究综述

1.2.1 自噬与 LC3 蛋白

自噬是将胞浆物质输送到溶酶体或液泡被降解的所有途径的通称,大致分为三类:巨自噬 (macroautophagy)、微自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。巨自噬 (以下简称自噬) 被认为是自噬的主要类型,与其他两种类型相比,关于它的研究更为深入和广泛,后文也将针对这一类型的自噬展开阐述^[10]。自噬发生时,细胞内由内质网形成隔离膜 (也称为吞噬体),隔离包括可溶性物质和细胞器在内的一小部分细胞质,形成自噬体。自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,而后其所含的内容物被水解酶降解。自噬体也可先同内涵体融合后再与溶酶体融合。这一过程十分复杂,多种关键基因和信号通路参与其中 (图 1-1)。

在哺乳动物细胞中，由 Unc-51 样激酶家族 (ULK1/ULK2)、ATG13 的哺乳动物同源物和 RB1 感应线圈 1 (RB1CC1/FIP200)，以及直接与 ATG13 结合的 C12orf44/ATG101 组成的复合物诱导形成自噬体^[11, 12]。在营养丰富的条件下，MTORC1 与复合物结合并通过磷酸化使 ULK1/2 和 ATG13 失活。而当细胞用雷帕霉素处理或处于饥饿条件下时，MTORC1 与复合物解离，ATG13 和 ULK1/2 被去磷酸化，从而允许复合物诱导巨自噬^[13]。自噬存在于所有真核细胞中，因此利用自噬系统来降解某些靶蛋白在新药研发领域有巨大潜力。

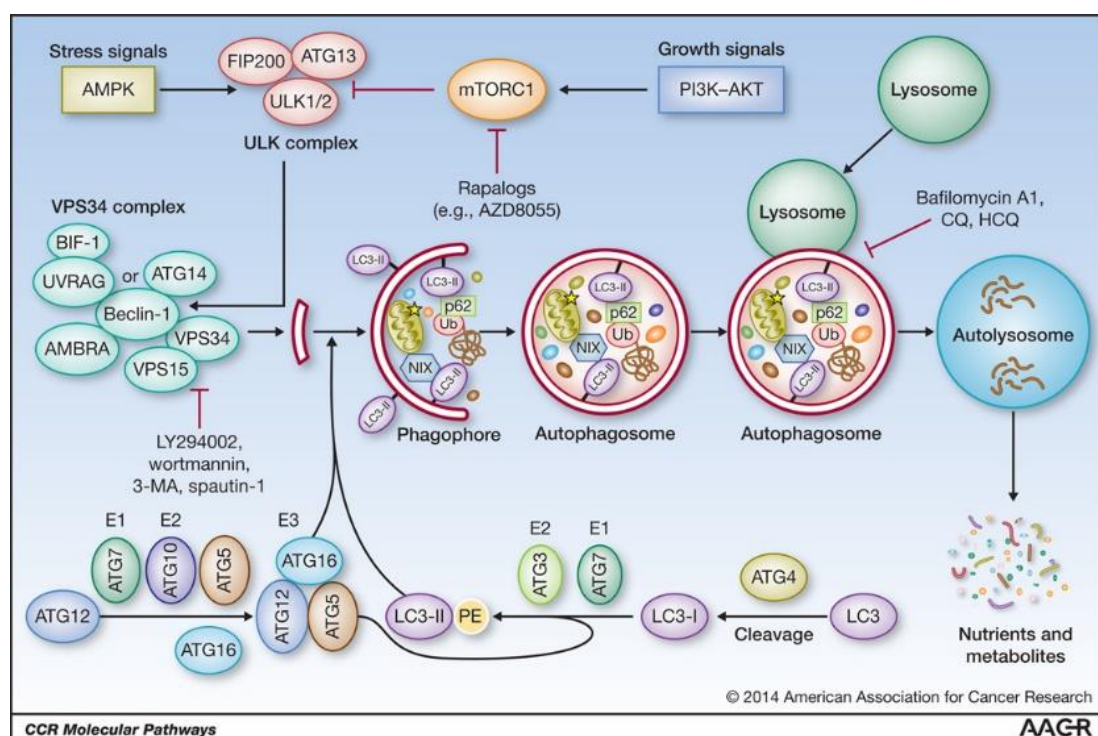


图 1-1 自噬的发生过程^[14]

在酵母和哺乳动物中，有两种涉及泛素样 (UBL) 蛋白的偶联系统，有助于自噬泡 (phagophore) 的扩增，分别为 Atg12-Atg5-Atg16 复合物和 Atg8/LC3 系统^[15]。LC3 是微管相关蛋白轻链 3，是酵母中 ATG8 蛋白在哺乳动物细胞中的同源物，包括 LC3A、LC3B、LC3C 三个亚型，其中 LC3B 在 ATG4B 等泛素样体系的修饰下由 LC3B-I 转变为 LC3B-II，并定位至自噬小体中，LC3B 在巨自噬诱导过程中合成显著增加^[16]，LC3B-II 的含量也可作为衡量自噬水平的重要标记，同时 LC3B-II 也允许 p62、NBR1、NDP52 等自噬受体的结合^[17]。

1.2.2 自噬途径的调控

巨自噬受细胞内和细胞外应激调控，包括营养饥饿、内质网应激、是否存在生长因子和缺氧等^[18]。mTOR 是自噬的负调控因子，其抑制剂雷帕霉素能够诱导

自噬而促进致病蛋白的降解，使其毒性降低^[19]。同时，胞质 Ca^{2+} 浓度的增加会导致钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 2 β (CAMKK2/CaMKK β) 激活 AMPK 并诱导巨自噬^[20]。此外，内质网应激能够通过未折叠蛋白反应 (UPR) 信号传导来诱导巨自噬，但也有学者认为其会导致细胞死亡^[18, 21]。即使在存在足够的营养的情况下，缺氧和缺乏生长因子也能够诱导巨自噬，其至少部分通过 mTOR 来进行调节。综上所述，在增强 mTOR 依赖的自噬途径的基础上同时提高 mTOR 非依赖的自噬水平是否对于致病蛋白的降解更加有效尚待研究，但自噬作为稳定细胞组分的重要工具，其被过度激活也会导致细胞死亡^[22]，因此，如何合理调控自噬的强度也亟待解决。神经退行性疾病的自噬机器受损且存在缺陷，全局性地提高自噬水平有助于全局性提高自噬的功能，特异且高效调控自噬的化合物亟待筛选和发现。

1.2.3 利用 LC3B 结合化合物调控自噬

LC3B 为衡量自噬水平的重要标记和调控蛋白降解的重要蛋白，对于 LC3B 结合化合物的筛选则有望实现对自噬水平的精准调控，具体可以从以下两方面进行研究：一是 LC3B 结合化合物能够在整体上调控自噬水平，这在治疗神经退行性疾病和抗衰老等领域具有应用前景。二是 LC3B 结合化合物不改变整体自噬水平，而是同时结合 LC3B 和底物（需降解的蛋白质或细胞器等）使其进入自噬体，从而清除特定的致病蛋白或损伤的细胞器。而对于脂质等非蛋白生物分子，其也具有重要的病理功能，实现 LC3B 结合化合物选择性降解非蛋白质生物分子，为药物发现开辟了新途径，是拓展自噬的化学干预手段的进一步应用。例如，使用能够同时结合 LC3B 和脂滴的化合物可通过自噬途径降低脂滴水平，且能够挽救因脂滴异常堆积而引发的疾病^[23]。由于神经退行性疾病患者的自噬水平在整体上是衰退的，因此，筛选合适的 LC3B 结合化合物从而实现从整体上提高自噬水平，将有望应用于亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)，脊髓小脑共济失调 1 型 (Spinocerebellar Ataxia Type1, SCA1) 等神经退行性疾病的治疗当中。通过微阵列高通量筛选确定 LC3B 结合化合物，并进一步验证其对自噬的调控作用，探究其作用的机理及其在神经退行性疾病中的应用，在理念和技术手段都具有极高的原创性，为神经退行性疾病的治疗提供了新思路。

1.2.4 亨廷顿病简介

亨廷顿病是单基因疾病^[24], 由单个基因 *HTT* 的 exon1 的 CAG 重复数目异常 (>35) 引起, 错误折叠的突变 HTT (mHTT) 蛋白^[25]在细胞内聚集形成包涵体产生毒性, 导致脑纹状体神经元死亡, 并引起肢体不受控运动、认知障碍等症状, 并最终导致机体死亡。mHTT 可通过巨自噬降解^[26], 研究证实降低致病蛋白水平可缓解疾病症状^[27]。

1.2.5 脊髓小脑共济失调 1 型简介

脊髓小脑共济失调 1 型是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病, 属于聚谷氨酰胺 (PolyQ) 疾病, 由 *ATXN1* 基因中的三核苷酸 (CAG) 重复扩增引起, 导致共济失调蛋白-1 (ATXN1) 中 PolyQ 束长度异常, 更易聚集形成核内包涵体 (IIB)^[28], ATXN1 IIBs 螯合多种蛋白质, 包括蛋白酶体和核糖体亚基, 泛素相关酶, 激酶和热休克蛋白等, 产生毒性并损害关键的细胞功能, 从而引起 SCA1 病理学症状, 患者特征为小脑萎缩, 以及脑干和脊髓的退化等^[29]。

1.3 研究内容与思路

本文通过 WesternBlot 技术探究 PAZ 对自噬水平的影响, 接着探究其作用是否依赖于 ATG4 蛋白酶、泛素化修饰系统, 是否影响溶酶体的生物合成, 接着作者使用双荧光报告系统, 来探究 PAZ 对于细胞中自噬流的影响, 然后使用 BioID 技术结合质谱分析, 比较药物作用前后 LC3B 蛋白互作谱差异, 并针对差异蛋白进行 siRNA 筛选验证, 筛选 PAZ 作用可能介导的关键蛋白, 最后在亨廷顿病患者的成纤维细胞和人源 iPSC 分化神经元以及小鼠神经前体细胞中探究 PAZ 的作用。

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞与组织样品

人胚肾细胞 (HEK-293T)、小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)、诱导多潜能干细胞 iPSCs、STHdh^{Q7/Q7} 小鼠神经前体细胞。

2.1.2 抗体

本论文所使用的抗体如表 2-1 所示。

表 2-1 抗体信息

抗体名称	生产厂商	货号
mCherry-Tag Mouse mAb	Abmart	M40012M
GFP-Tag Mouse MeAb	Proteintech	10025566
HA-Tag(26D11) mAb	Abmart	M20003
Rabbit Anti-TFEB	Bethyl	042767-APC.200
LC3B polyclonal Antibody	Invitrogen	PA5-32254
Anti-NBR1 antibody	Abcam	Ab126175
Anti-polyQ specific Antibody, clone MW1	Sigma-Aldrich	MABN2427
Anti-SQSTM1 / p62 antibody	Abcam	Ab109012
β-Tubulin Mouse mAb	Abclonal	AC021
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Abmart	M21002
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Abmart	M21001

2.2 实验耗材、仪器与软件

本论文所使用的各项实验试剂如表 2-2 所示：

表 2-2 实验试剂

试剂名称	生产厂商	货号
细胞实验：		
DMEM/High Glucose	Cytiva	SH20243.01
DMSO	Sigma-Aldrich	D5879
FBS	Cytiva	SH30396.02
Lipofectamine™ 2000 转染试剂	Thermo scientific	11668019
Lipofectamine™ 3000 转染试剂	Thermo scientific	L300075

Opti-MEM	Gibco	11058021
Antibiotic-Antimycotic	Gibco	15240062
Phosphate Buffered Saline (1×)	Cytiva	SH30256.01
TrypLE™ Express	Gibco	12605028
Trypan Blue	Invitrogen	T10282
分子克隆:		
Agar	沪试	10000561
NaCl	沪试	10019308
Tryptone	OXOID	LP0042B
Yeast Extract	OXOID	LP0021B
高保真 PCR 酶	TOYOBO	KOD-211
无内毒素质粒大提试剂盒	TIANGEN	DP117
无水乙醇	沪试	10009218
75%乙醇	沪试	80176961
异丙醇	沪试	40064360
Gel-red	Beyotime	D0140
LDS Sample buffer	Invitrogen	NP0008
TAE	Beyotime	ST716
DL2,000 DNA Marker	Takara	3427A
蛋白免疫印迹:		
DTT	Invitrogen	R0861
三色预染蛋白 Marker	Thermo scientific	26619
NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen	NP0008
Phosphatase inhibitor cocktails	ROCHE	11836170001
Triton X-100	Sangon	A600198
TBS/Tween 缓冲液	雅酶	PS103
NON-Fat Powdered Milk	Sangon	A600669
SuperSignal™ West Pico PLUS	Thermo scientific	34580
Stripping Buffer	康为世纪	CW0056M
BCA 试剂	Beyotime	P0011-1
免疫荧光染色:		
Bovine serum albumin	Sangon	A600332
4%组织细胞固定液	Solarbio	P1110
DAPI 染色液	Beyotime	C1005
抗荧光淬灭封片液	Beyotime	P0126

BioID:

Tris-HCl (pH7.4)	Beyotime	ST774
Tris-HCl (pH7.5)	Beyotime	ST775
Tris-HCl (pH 8.1)	Beyotime	ST781
SDS	沪试	30166428
EDTA	沪试	10009617
Streptavidin Beads	Beyotime	P2151
Glycine	沪试	62011516

本论文所使用的各项实验耗材如表 2-3 所示:

表 2-3 实验耗材

试剂名称	生产厂商	货号
Nunc™血清移液管	Thermo Scientific	170356N
移液器吸头	瑞宁	RC UNV
Microtubes	康宁	AXYMCT150CS
PCR Tubes	康宁	PCR-02-C
细胞培养瓶	Thermo Scientific	156367
6 孔板	康宁	353244
96 孔板	康宁	3358
粘附载玻片	世泰	188105
封口膜	Parafilm	PM-996
凝胶托盘	CAVOY	SC-3606
一次性加样槽	洁特生物	LTT002025
医用检查手套	施瑞康	F840
细胞计数腔室载玻片	Invitrogen	C10228
15 mL 一次性离心管	洁特生物	CFT011150
50 mL 一次性离心管	洁特生物	CFT011500
1.5 mL 微量离心管	AXYGEN	MCT-150-C
磁力架	Beyotime	FMS012
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen	NP0336PK2
iBlot™ 3 小型硝酸纤维素转印膜组	Invitrogen	IB33002
PCR Purification Kit	QIAGEN	28104

本论文所使用的各项实验仪器如表 2-4 所示:

表 2-4 实验仪器

组成	品牌	型号
----	----	----

S1 移液管移液器	Thermo Scientific	9541
移液器	瑞宁	L-200XLS
高速离心机	湘仪	L550
高速离心机	Eppendorf	5424R
循环水式多用真空泵	狮鼎	SHB-III
干式恒温器	Kylin-Bell	GL-150B
倒置共聚焦显微镜	ZEISS	LSM-880
Countess II 全自动细胞计数仪	Invitrogen	AMQAX1000
三温三控水槽	博迅实业	DK-8D
超声波细胞破碎仪	QSONICA	Q800R3
涡旋震荡仪	Scientific industries	SI-0236
酶标仪（微孔板读数仪）	PerkinElemer	2105
小型垂直电泳槽	Invitrogen	A25977
浸没式水平电泳槽	CAVOY	SC-1212
iBlot 3 Western Blot 转印系统	Invitrogen	IB31001
Veriti™ 96 孔快速热循环仪	Applied Biosystem	4375305
化学发光成像系统	勤翔	6100
电热鼓风干燥箱	博迅实业	GZX-9070MBE
脱色摇床	Kylin-Bell	TS-8
低温冰箱	海尔	HYC-85FD
Milli-Q 纯水仪	Merck	ZIQ7000T0C
单人净化工作台	苏州净化	SW-CJ-1G

2.3 实验软件

本论文使用的各项实验软件如下：ZEN blue (2.3lite, ZEISS)、Image J (1.51j8, NIH)、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software)。

2.4 实验方法

2.4.1 细胞转染

用 Lipofectamine 2000 在细胞 70 ~ 90%汇合时进行转染。在 Opti-MEM 培养基中稀释 Lipofectamine 试剂，并在 Opti-MEM 培养基中稀释 DNA。将稀释的 DNA 按 1:1 的比例加入稀释的 Lipofectamine 2000 试剂中，等待 15 min，然后向细胞中加入 DNA-脂质复合物。细胞在 37℃下培养 6 h，更换为新鲜 DMEM 培养基 (90%DMEM + 10%FBS)。

2.4.2 Western Blot

用裂解液（1%Triton X-100 in PBS + 1×蛋白酶体抑制剂）裂解细胞，用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 4×NuPAGE LDS Sample Buffer 和 10×DTT，用裂解液补至相同体积，70℃加热 10 min。使用 3-8%梯度胶或 4-12%梯度胶 (Thermofisher Scientific) 分离蛋白。使用 iBlot3 仪器将蛋白质条带转移到硝酸纤维素薄膜上 (25V, 6 min)，5%脱脂牛奶封闭 1 h，TBST 洗涤 3 次。分别在蛋白膜上加入对应的“一抗”，在 4℃孵育过夜，TBST 洗涤 3 次。加入“二抗”室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次。配置显影液，在化学发光成像系统上显影。显影完毕后加入 Stripping Buffer，置于摇床上洗涤 30 min，接着重新封闭并进行下一次的抗体孵育和成像。

2.4.3 免疫荧光技术

将用 70%酒精浸泡的盖玻片在 PBS 中洗涤，接着在六孔板底部滴加微量 PBS 用于吸附玻片防止移位。用镊子将洗好的盖玻片轻轻置于液滴上。将混匀的细胞悬液滴加至六孔板内，十字轻轻摇匀，置于 33℃恒温培养箱中培养，培养至细胞汇合度在 50%左右时弃去培养基，加入 4%组织细胞固定液固定 10 min。接着将 1: 500 混于 PBS 中的 3342 (DAPI) 染料加至六孔板内（后续需要避光），4℃孵育 5 min，弃去染料，PBS 洗涤一次。在载玻片中央滴加微量抗荧光淬灭封片剂，用镊子将玻片翘起，置于载玻片上，使用指甲油在玻片四周涂抹固定（注意不要推动玻片），置于 4℃保存。若需要进行抗体孵育，则在 4%组织细胞固定液固定后，加入 5% Triton X-100 穿透 10 min，接着 4% BSA 孵育 20 min，再加入 1: 400 稀释于 4%BSA 中的一抗置于 4℃孵育过夜。回收一抗，PBS 洗涤一次，再加入 1: 400 稀释于 4% BSA 中的二抗，室温孵育 1 h，然后依次使用 DAPI 染料进行染色并封片保存。接着使用 Zeiss-LSM880 超分辨共聚焦显微镜进行拍摄。

2.4.4 质粒构建

将公司合成的引物 12000 rpm 离心 5 min，并加对应量的 ddH₂O 溶解离心，将 F/R 两段引物混合，稀释到 10 μM，PCR 反应体系如表 2-5 所示，PCR 反应程序如表 2-6 所示。

表 2-5 PCR 体系

组分	体积
10×Buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
2.5 mM MgSO ₄	2 μL

引物 (F+R)	3 μ L
模板 DNA (质粒 50 ng; 基因组: 10-200 ng)	1 μ L
DMSO	1 μ L
ddH ₂ O	32 μ L
KOD plus	1 μ L

表 2-6 PCR 反应程序

反应步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	
变性	98°C	10 s	35 cycles
退火	72°C	20 s	
延伸	68°C	72 s	
彻底延伸	72°C	5 min	
保存	4°C	∞	

使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物，采用双酶切方法分别切割载体和 PCR 产物，接着使用 T4 连接酶连接载体和目的片段，室温孵育 30 min 后在冰上取 10 μ L 加入 50 μ L 感受态细胞中 (DH5 α)，冰浴 30 min，42°C 热激 45 s，迅速冰浴 2 min，将混匀后的体系加入 200 μ L 无抗培养基（配方如表 2-7 所示）中，置于 37°C 摇床中扩大培养 1 h。接着，取 100 μ L 菌液涂布于对应抗性的固体培养基上置于 37°C 倒置培养 12-16 h，挑取单菌落置于 37°C 摇床中扩大培养，将菌液送测，比对测序结果，选择正确的测序结果对应菌液进行质粒提取。

表 2-7 培养基配方

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
加 1 mL 1M NaOH，灭菌条件：121°C，高压湿热，20 min。		

2.4.5 BioID

细胞转染 BirA-Myc，Myc-BirA-LC3B 质粒，48 h 后加入生物素。72 h 后，用 BioID 裂解缓冲液（50 mM Tris-HCl (pH7.4)，500 mM NaCl，0.4% SDS，5 mM EDTA，1 $\times$ 蛋白酶抑制剂，1 $\times$ 磷酸酶抑制剂）在 25°C 下裂解细胞，并超声处理以

进一步剪切 DNA。加入 2% Triton X-100，然后再次超声处理。离心样品 (4°C, 16,000 rpm, 15 min)，加入 1/5 体积的 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 和 Streptavidin Beads，4°C 孵育过夜。加入 1/5 体积的 5×SDS，在 95°C 下加热。在冰上加入 IP 缓冲液 (Lysis Buffer, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4))，离心或置于磁力架上分离样品，弃去上清，取 1 mL Washing Buffer (PBS (pH 7.4), 0.05% Tween-20) 加入分离得到的磁珠中，充分震荡重悬磁珠，将离心管置于磁力架上分离 1 min，去除上清，重复洗涤 3-4 次。接着，向每个样品加入 100μL Acid Elution Buffer (0.1M Glycine (pH2.0))，混匀后室温孵育 5 min，然后置于磁力架上分离 1 min，转移上清至干净离心管中，置于 -20°C 保存。

2.3.5 神经元的分化

取出待分化 iPSC 细胞制成干细胞悬液，离心后弃去上清，加入干细胞诱导分化培养液悬浮细胞，37°C 5% CO₂ 下培养。Day 2 换液，Day 4 换为干细胞诱导分化培养液（含 10% 血清），Day 5 换成干细胞诱导分化培养液，Day 9 用干细胞诱导分化培养液将神经干细胞吹打下来制成悬液，离心弃去上清后，加入干细胞诱导分化培养液（含 B27）悬浮培养，隔天换液，直至 Day 30。吸取细胞悬液至离心管，离心弃去上清后，加入胰酶，37°C 消化 3 min；加入神经元完全培养液，离心后弃去上清；加入神经元完全培养液，吹打后静置数分钟，收集上清，重复一次，收集所有上清。将细胞铺入经 Laminin（1:30 稀释）包被的 24 孔板内，于 37°C 5% CO₂ 下培养。

神经干细胞诱导分化完全培养液：485 mL DMEM/F12 + 5 mL 100* N2 + 5 mL 100* NEAA + 5 mL L-Glutamax；神经元完全培养液：485 mL Neuronbasal + 5 mL 100* N2 + 10 mL 50* B27 + 100 μg/mL BDNF/GDNF/IGF + 200 μg/mL Vitamin C；iPS 细胞完全培养液：392.5 mL DMEM/F12 + 5 mL 100* NEAA + 2.5 mL 100* L-Glutamax + 3.5 μL beta-ME + 100 mL KOSR + 10 ng/mL BFGF。

2.3.6 数据分析与制图

使用 T 检验比较两组间的显著性差异，以 $P < 0.05$ 表示有统计差异，其中* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ ，使用 GraphPad Prism 9 制图，数据以平均值 ± 标准误 (Mean ± SEM) 表示。

三、研究结果

3.1 PAZ 提高自噬水平

p62 是多功能泛素结合蛋白，通过自噬-溶酶体途径降解，其表达量也一定程度上反映出自噬的水平^[30]。NBR1 是另一种选择性自噬受体，其不需要 p62 即可通过自噬降解^[31]。本文评估了 PAZ 对于自噬底物的降解的影响。结果显示自噬底物 p62 和 NBR1 的水平随着 PAZ 浓度的增加而逐渐下降，表明 PAZ 能够一定程度提高自噬水平（图 3-1 A）。

3.2 PAZ 促进自噬流

此外，本文通过双荧光报告系统，即 mCherry-GFP 标记的 LC3B（图 3-1B）来评估单细胞内的自噬流情况。与 mCherry 不同，GFP 对低 pH 值敏感，因此 LC3B-mCherry-GFP 阳性自噬体中的 GFP 信号在自噬体与溶酶体融合时淬灭^[32, 33]。因此，自噬功能完整的细胞具有较低绿色荧光蛋白 (GFP) 信号，融合后显示为红色，而自噬功能缺陷的细胞 GFP 信号较高，融合后显示为黄色。加入 PAZ 后，表达 LC3B-mCherry-GFP 的 WT 细胞积累了 mCherry 阳性但 GFP 阴性的聚集体，这与自噬体与溶酶体融合和自噬流的完整相一致。相反，在作为对照的 DMSO 处理下，表达 LC3B-mCherry-GFP 双荧光载体的 MEFs 呈现出 mCherry-GFP 双阳性（图 3-1 C）。因此，PAZ 能够促进自噬流。

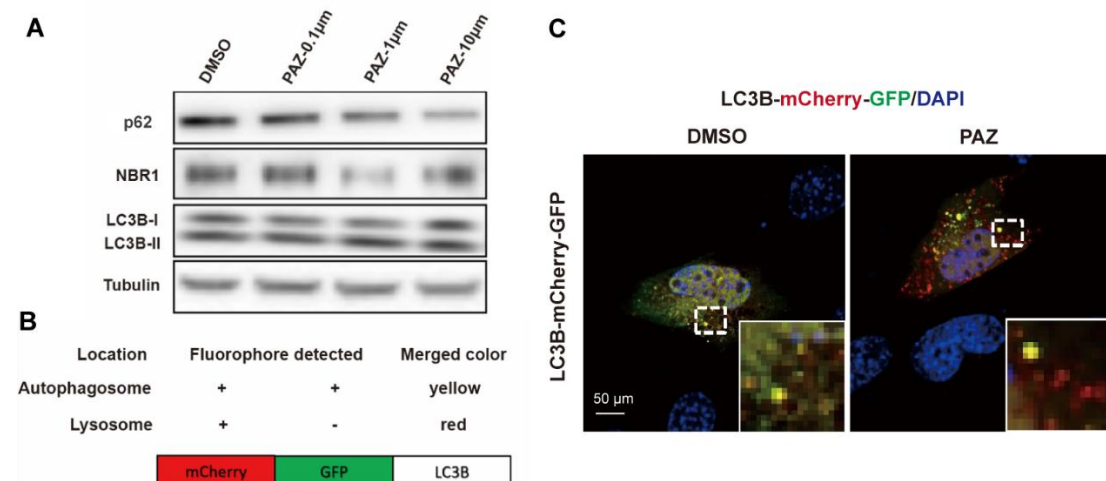


图 3-1. PAZ 正向调控自噬流

A. DMSO 对照组和 PAZ (0.1、1、10 μm) 中自噬底物 p62、NBR1 以及自噬水平标志物 LC3B-I、LC3B-II 的表达水平；B. 双荧光载体 LC3B-mCherry-GFP 监测自噬流的原理图；C. 分别在 DMSO、PAZ 中培养的 WT 细胞的显微镜图像，Scale Bar = 50 μm

3.3 PAZ 对自噬的作用不依赖于泛素化修饰系统和溶酶体生物发生

除巨自噬参与完成蛋白降解外,分子伴侣介导的选择性自噬也参与了降解过程,即 CMA 途径。研究证实,许多伴侣蛋白参与了 CMA 介导的自噬过程,如分子伴侣蛋白 Hsc70 能够偶联在 mHTT 蛋白 C 端,其过表达导致致病蛋白泛素化增强,更易通过自噬途径降解^[34]。为了进一步探究 PAZ 影响自噬水平的机制,本文评估了细胞内可以反映泛素化修饰的泛素水平以及调控溶酶体生物合成相关基因的转录因子 TFEB^[35, 36]的水平。结果显示,加入 PAZ 并不影响泛素和 TFEB 的表达水平(图 3-2 A-D),说明 PAZ 对自噬水平的调节不依赖于泛素化修饰系统,也不改变溶酶体的生物发生。

3.4 PAZ 对自噬的作用不依赖于 ATG4A 和 ATG4B

自噬由数十种自噬相关(ATG)蛋白介导,其中 ATG4 是唯一通过加工和解偶联 ATG8 调节自噬的蛋白酶,哺乳动物中至少保留了四种 ATG4 同源物,分别为 ATG4A(自噬蛋白-2)、Atg4B(自噬蛋白-1)、Atg4C(自噬蛋白-3)和 Atg4D(自噬蛋白-4),且这些同源物之间的蛋白酶活性明显不同,Atg4C 和 4D 对任何类型的哺乳动物 Atg8 同源物都显示出很低的蛋白酶活性^[37]。由于 ATG4 的活性对于自噬过程是必需的,且具有高度特异性,因此作者探究了 PAZ 对自噬的作用是否依赖于 ATG4 蛋白酶。结果显示,与对照组相比,加入 PAZ 并不影响细胞内 ATG4A 和 ATG4B 的表达水平(图 3-2 E-I),说明 PAZ 对自噬水平的调节不依赖于 ATG4A 和 ATG4B 蛋白酶。

3.5 PAZ 影响自噬流介导的关键蛋白筛选

接下来,本文筛选了 LC3B 结合化合物 PAZ 影响自噬流可能介导的关键基因,作者使用临近蛋白标记技术 BioID 系统,其工作原理是生物素连接酶能使其周围的蛋白带上生物素标记,同时生物素又能和链霉亲和素紧密结合,从而可以利用链霉亲和素偶联的磁珠富集目标蛋白。BioID 结合质谱分析,比较药物作用前后 LC3B 结合蛋白复合物的差异,并根据 LC3B 蛋白组的差异采用 siRNA 文库筛选,进一步确定关键蛋白(图 3-2 J-K)。其中包括与脂质代谢相关的 ACLY(ATP-柠檬酸裂解酶, ATP-citrate lyase)^[38]、与铜代谢相关的 ATP7B(铜转运 ATP 酶 β , ATPase Copper Transporting Beta)^[39]以及 SNARE 复合物之一,囊泡运输和融合的关键调节因子 STX7(突触融合蛋白 7, syntaxin7)^[40]等。

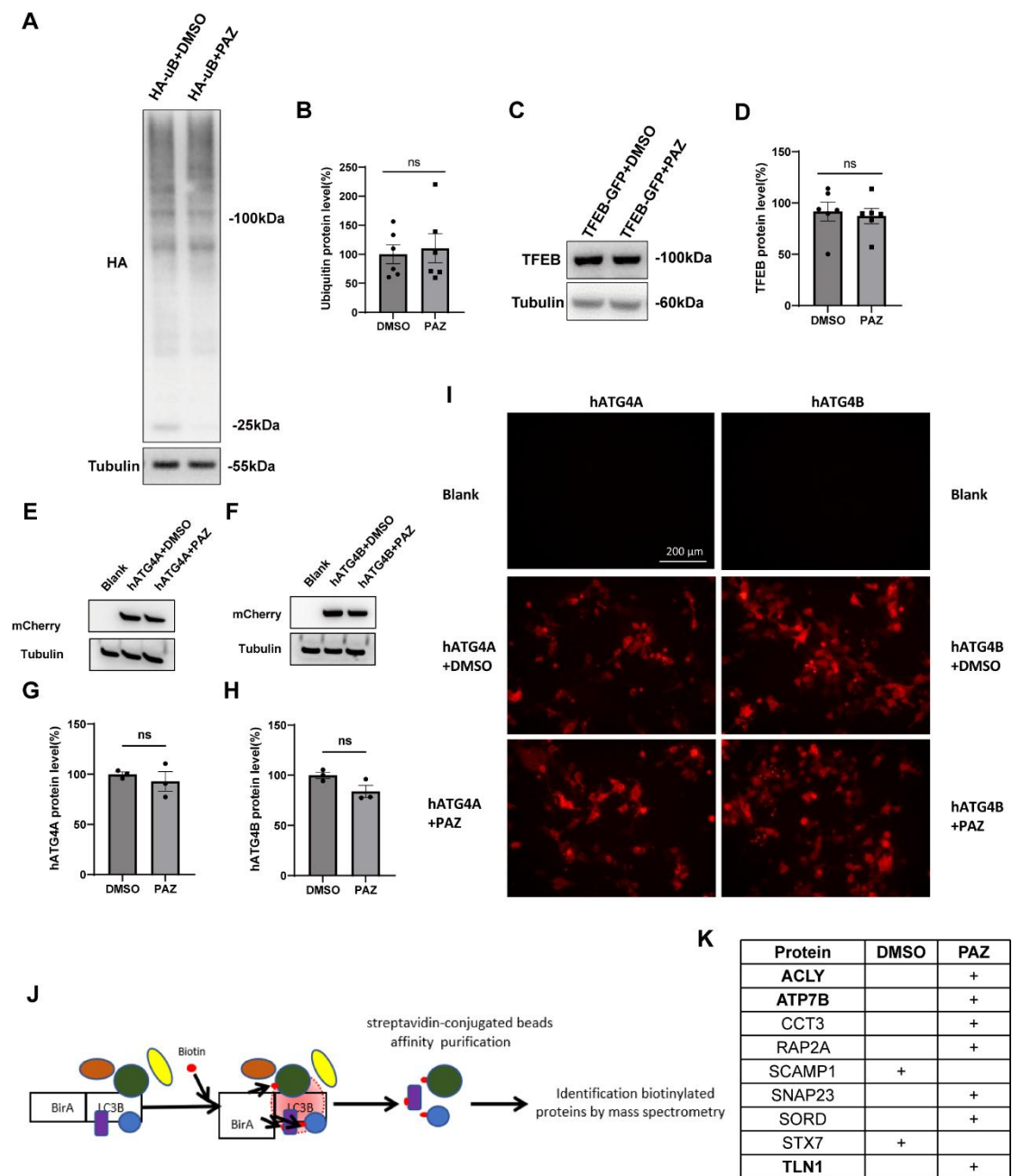


图 3-2. PAZ 影响自噬的机制

A-B. 分别使用 DMSO 和 PAZ 处理后细胞中泛素水平。T 检验， $P > 0.05$ ；C-D. 分别使用 DMSO 和 PAZ 处理后细胞中 TFEB 水平。T 检验， $P > 0.05$ ；E-H. 分别使用 DMSO 和 PAZ 处理后细胞中 ATG4A 和 ATG4B 水平。T 检验， $P > 0.05$ ；I. Blank 组不进行转染，对照组转染 mCherry-hATG4A 质粒并用 DMSO 处理，实验组转染 mCherry-hATG4A 质粒并用 PAZ 处理的荧光拍摄结果，hATG4B 同上，Scale Bar: 200 μm；J. BioID 原理图；K. 经 BioID、质谱分析和 siRNA 验证后得到的候选蛋白

3.6 PAZ 在小鼠神经前体细胞中减少 ATXN1 聚集

为了探究 LC3B 结合化合物 PAZ 在 SCA1 疾病模型中的作用，作者研究了 PAZ 对小鼠神经前体细胞中 ATXN1 的聚集水平是否有降低作用。结果显示，与

对照组相比, 加入 PAZ 后, 小鼠神经前体细胞中野生型和突变型 ATXN1 聚集体的大小显著减小, 并且在加入 BafA 阻断自噬途径后, PAZ 的作用也被阻断 (图 3-3 A-C), 说明 PAZ 通过调控自噬水平减少 ATXN1 的聚集。

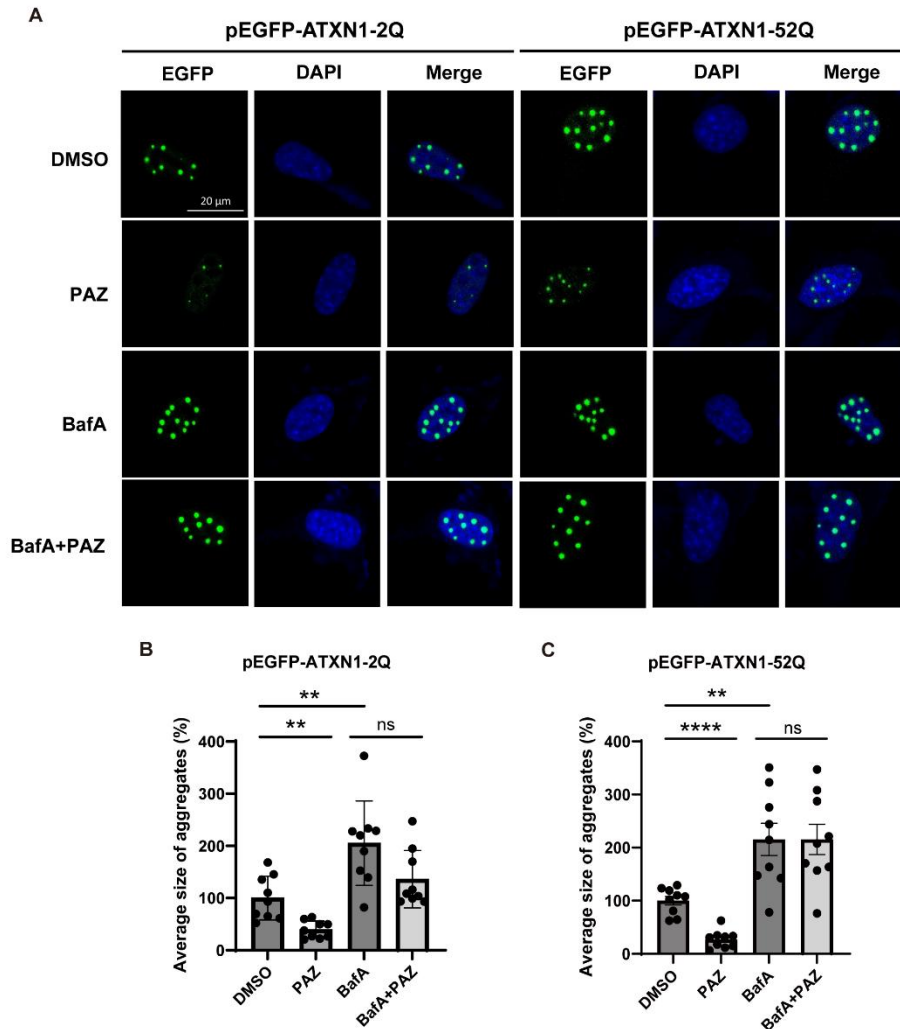


图 3-3. PAZ 在 SCA1 患者前体细胞模型中能够显著减少 ATXN1 聚集

A. 分别使用 DMSO、PAZ、BafA、BafA+PAZ 处理后的神经前体细胞的荧光显微镜图像, Scale Bar: 20 μ m; B. 使用 GraphPad 统计显微镜图像中 ATXN1 聚集体的平均面积, unpaired t test 统计得, 2Q: DMSO vs PAZ: $p=0.0010$, DMSO vs BafA: $p=0.0032$, BafA vs BafA+PAZ, $p=0.0506$; 52Q: DMSO vs PAZ: $p<0.0001$, DMSO vs BafA: $p=0.0020$, BafA vs BafA+PAZ, $p=0.9981$

3.7 PAZ 在 HD 患者成纤维细胞和人源 iPSC 分化神经元中具有挽救作用

为了探究 LC3B 结合化合物 PAZ 在疾病模型中的作用, 作者探究了 PAZ 对 HD 患者成纤维细胞及人源 iPSC 分化神经元是否存在挽救作用。结果显示, 与对照组相比, 加入 PAZ 后, HD 患者成纤维细胞中自噬底物 p62 的水平和特异性结合突变型 HTT 扩展 PolyQ 区域的 MW1 水平均有所下降, 且突变型 HTT 蛋白

的水平也显著下降 ($P=0.0011$), 表明在 HD 患者的成纤维细胞中 PAZ 能够有效提高自噬水平, 降低突变型 HTT 蛋白的水平 (图 3-4 A)。与野生型神经元相比, 患者神经元在不含 BDNF 的培养基中培养 48h 后神经元大量死亡且形态异常, 而添加 PAZ 后患者神经元 48h 后仍保持数目和形态良好, 挽救了由 mHTT 积累带来的神经元死亡, 与使用 siRNA 干扰 HTT 表达得到的结果相一致 (图 3-4 B)。

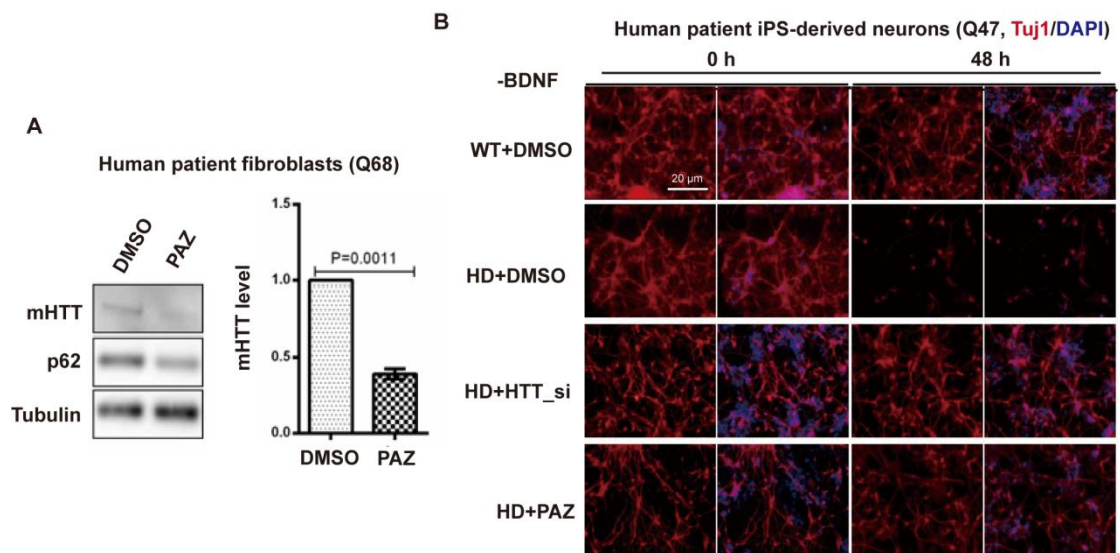


图 3-4. PAZ 在 HD 患者成纤维细胞和人源 iPSC 分化神经元模型中具有挽救作用
A. 分别使用 DMSO 和 PAZ 处理后细胞中 p62 和 mHTT (使用 MW1 抗体检测) 水平。T 检验, $P=0.0011$; B. 使用 DMSO 处理的野生型神经元及分别使用 DMSO、HTT_si、PAZ 处理的 HD 患者人源 iPSC 分化神经元在不含 BDNF 的培养基中培养 0 h 和 48 h 的显微镜图像, Scale Bar: 20 μm

四、讨 论

通过本项研究，作者发现 LC3B 结合化合物 PAZ 能够增强自噬水平，其并不依赖于泛素化修饰系统，也不改变溶酶体的生物发生，而是通过正向调节自噬流整体性提高自噬水平。通过筛选作者发现了 PAZ 可能介导的关键蛋白，其中有些在以往的研究中已经表明与自噬过程有关，例如 STX7（突触融合蛋白 7）、SNAP23（突触体相关蛋白 23），也有还未被揭示与自噬过程相关的蛋白，例如与脂质代谢相关的 ACLY（ATP-柠檬酸裂解酶）^[38]、与铜代谢相关的 ATP7B（铜转运 ATP 酶 β ）^[39]以及遗传学运动神经病变相关的 SORD（山梨酸脱氢酶）^[41]。未来作者会进一步对 PAZ 介导关键蛋白影响自噬的机制进行研究，并从结构上进行解析。

结果表明，PAZ 能够正向调节自噬流，这说明其可能影响自噬体和溶酶体的融合。先前研究认为，细胞内膜融合机制的依赖于 SNARE（可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感融合蛋白）复合物和 SM（Sec1 / Munc18 样）蛋白两种必需成分，位于囊泡和靶膜的 SNARE 蛋白拉链形成一个 α -螺旋束，将两层膜紧紧地拉在一起，以施加融合所需的力量。形状像扣子的 SM 蛋白与反式 SNARE 复合物结合，指导其融合作用，两者可通过组合方式和稳定性实现对融合的特异性精细调节^[42]，因此 PAZ 是否影响 SNARE 的招募及 SNARE 和 SM 蛋白之间的互作仍需进一步探究。

此外，可能存在其他的 LC3B 结合化合物能够同时结合 LC3B 和底物（需降解的蛋白质或细胞器等）使其进入自噬体，从而清除特定的致病蛋白或损伤的细胞器。对于脂质等非蛋白生物分子，其也具有重要的病理功能，实现 LC3B 结合化合物选择性降解非蛋白质生物分子，是拓展自噬的化学干预手段的进一步应用。例如，使用能够同时结合 LC3B 和脂滴的化合物可通过自噬途径降低脂滴水平，且能够挽救因脂滴异常堆积而引发的疾病^[23]。

综上，本文筛选出了一种能正向调节自噬的 LC3B 结合化合物，有望准确、全面地修复自噬系统，进而提高自噬药物在神经退行性疾病治疗领域的潜力。

参考文献

- [1] HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice [J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-9.
- [2] KOMATSU M, WAGURI S, CHIBA T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice [J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 880-4.
- [3] AMARAVADI R K, YU D, LUM J J, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(2): 326-36.
- [4] LEVINE B. Cell biology: autophagy and cancer [J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 745-7.
- [5] MIZUSHIMA N, KLIONSKY D J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism [J]. *Annu Rev Nutr*, 2007, 27: 19-40.
- [6] RUBINSZTEIN D C, MARIÑO G, KROEMER G. Autophagy and aging [J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682-95.
- [7] ZHONG Z, SANCHEZ-LOPEZ E, KARIN M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment [J]. *Cell*, 2016, 166(2): 288-98.
- [8] TSUKADA M, OHSUMI Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEBS Lett*, 1993, 333(1-2): 169-74.
- [9] JOHNSON S, ADELMANN A, CLABOTS C R, et al. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism [J]. *J Infect Dis*, 1989, 159(2): 340-3.
- [10] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-75.
- [11] HOSOKAWA N, SASAKI T, IEMURA S, et al. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13 [J]. *Autophagy*, 2009, 5(7): 973-9.
- [12] MERCER C A, KALIAPPAN A, DENNIS P B. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5): 649-62.
- [13] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1981-91.
- [14] CICCHINI M, KARANTZA V, XIA B. Molecular pathways: autophagy in cancer--a matter of timing and context [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(3): 498-504.
- [15] WEIDBERG H, SHVETS E, ELAZAR Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 125-56.

- [16] KIRISAKO T, BABA M, ISHIHARA N, et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(2): 435-46.
- [17] FILIMONENKO M, ISAKSON P, FINLEY K D, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(2): 265-79.
- [18] HE C, KLIONSKY D J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 67-93.
- [19] SARKAR S, RAVIKUMAR B, FLOTO R A, et al. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 46-56.
- [20] HØYER-HANSEN M, BASTHOLM L, SZYNIAROWSKI P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2 [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193-205.
- [21] DING W X, NI H M, GAO W, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4702-10.
- [22] RUI Y N, XU Z, PATEL B, et al. HTT/Huntingtin in selective autophagy and Huntington disease: A foe or a friend within? [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 858-60.
- [23] FU Y, CHEN N, WANG Z, et al. Degradation of lipid droplets by chimeric autophagy-tethering compounds [J]. *Cell Res*, 2021, 31(9): 965-79.
- [24] WALKER F O. Huntington's disease [J]. *Lancet*, 2007, 369(9557): 218-28.
- [25] A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group [J]. *Cell*, 1993, 72(6): 971-83.
- [26] SARKAR S, RUBINSZTEIN D C. Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy [J]. *Febs j*, 2008, 275(17): 4263-70.
- [27] YU S, LIANG Y, PALACINO J, et al. Drugging unconventional targets: insights from Huntington's disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(2): 53-62.
- [28] CUMMINGS C J, ORR H T, ZOGHBI H Y. Progress in pathogenesis studies of spinocerebellar ataxia type 1 [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 354(1386): 1079-81.
- [29] LAIDOU S, ALANIS-LOBATO G, PRIBYL J, et al. Nuclear inclusions of pathogenic ataxin-1 induce oxidative stress and perturb the protein synthesis machinery [J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101458.
- [30] KOMATSU M, WAGURI S, KOIKE M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1149-63.
- [31] KIRKIN V, LAMARK T, SOU Y S, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates [J]. *Mol Cell*, 2009, 33(4): 505-16.

- [32] N'DIAYE E N, KAJIHARA K K, HSIEH I, et al. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation [J]. EMBO Rep, 2009, 10(2): 173-9.
- [33] KLIONSKY D J, ABDEL-AZIZ A K, ABDELFATAH S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1) [J]. Autophagy, 2021, 17(1): 1-382.
- [34] JANA N R, DIKSHIT P, GOSWAMI A, et al. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11635-40.
- [35] SARDIELLO M, PALMIERI M, DI RONZA A, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function [J]. Science, 2009, 325(5939): 473-7.
- [36] SETTEMBRE C, DI MALTA C, POLITO V A, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis [J]. Science, 2011, 332(6036): 1429-33.
- [37] MARUYAMA T, NODA N N. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition [J]. J Antibiot (Tokyo), 2017, 71(1): 72-8.
- [38] FENG X, ZHANG L, XU S, et al. ATP-citrate lyase (ACLY) in lipid metabolism and atherosclerosis: An updated review [J]. Prog Lipid Res, 2020, 77: 101006.
- [39] TERADA K, SCHILSKY M L, MIURA N, et al. ATP7B (WND) protein [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(10): 1063-7.
- [40] WANG H, FRELIN L, PEVSNER J. Human syntaxin 7: a Pep12p/Vps6p homologue implicated in vesicle trafficking to lysosomes [J]. Gene, 1997, 199(1-2): 39-48.
- [41] REBELO A P, ABAD C, DOHRN M F, et al. SORD-deficient rats develop a motor-predominant peripheral neuropathy unveiling novel pathophysiological insights [J]. Brain, 2024.
- [42] SÜDHOF T C, ROTHMAN J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins [J]. Science, 2009, 323(5913): 474-7.

致 谢

四年本科时光匆匆而过，回首望去，有欢笑，有泪水，有雀跃，有酸楚，如今，都已变成满铺的鲜花，为我送行，去奔赴更远的山海。

得遇良师，春风化雨，人生至幸。感谢导师付玉华老师的指导与帮助，一路走来，是您的悉心指导与不吝赐教，让我从一开始的手忙脚乱，处处踩坑到如今的有条不紊，按部就班。当我实验碰壁时，您总是会安慰我说失败很正常，并帮我找原因，想办法。您像一剂强心针，让我充满自信，干劲十足，您也像一个百宝箱，让我从无后顾之忧，勇于尝试各种方法，很幸运能够做您的学生，祝您工作顺利，阖家幸福。

感谢鲁伯垠老师对本文的指导与帮助，您时常关心我们的科研进度和遇到的困难，在您的管理下，实验室运行得井井有条，大家团结友爱，产出丰硕。感谢王朵佳同学、杨嘉鑫师兄、王舒婷师姐、赵御佳师姐在实验过程中的引领与指导！

感恩我的父母，是你们的无私奉献让我有机会在复旦读书，你们在精神和物质上的大力支持让我在几千公里外的上海仍能够生活得自在舒适。成长过程中无数个寒冷的冬夜和未明的清晨都有你们的陪伴，我知道，我不是一个人在奋斗。当我遭受打击，情绪低落时，你们义无反顾地飞来上海看我，带我游山玩水，我也相信我们会一起去更多的地方，因为我们从未停止前进的脚步。

感谢我的朋友王子晗、何佳颖、刘沐尧，你们常常拉着比较内向的我一起出去玩，让我也慢慢有勇气去主动邀请你们。在慌张的期末季和夏令营，我们互相分享学习资料，加油打气，少了很多的内耗和焦虑。闪闪发光的你们也把我点亮，让我们一起走花路叭！

特别感谢张洲嘉，相遇时就仿若老友，很幸运能和你相互扶持，见证彼此的蜕变与成长。在你的鼓励下，我变得更有自信，更勇敢，也尝试了很多以前不敢做的新鲜事物。谢谢你愿意陪我一起完成我的愿望清单，我们执手，顶峰相见！

最后，我想感谢我自己，在很多个由宇宙和历史的偶然构成的沉浮中，我依旧坚定地向前走着。