

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

檢視愛滋海默症蛋白質與細胞膜間之交互作用以了解愛滋
海默症之神經毒性機制

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2218-E-002-035-

執行期間：92年10月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：王勝仕

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 3 日

檢視阿滋海默症蛋白質與細胞膜間之交互作用以了解阿滋海默症之神經毒性機制

計畫編號：92-2218-E-002-035

王勝仕

國立台灣大學化學工程學系

中文摘要

本研究擬利用表面電漿共振光譜技術對 A β 與細胞膜間之鍵結或交互作用進行及時觀測。表面電漿共振光譜技術之故乃在利用其高靈敏度、快速、即時、不需標記及破壞分析物等之優點。細胞膜與 A β 間之鍵結動力學行為是藉由 SPR 光譜來決定的，而細胞膜與 A β 二成份間之交互作用是在金上鍍有一層特殊化合物之 SPR chip 上進行。在接有磷脂質細胞膜 SPR chip 上流過特定濃度之 A β 溶液，以 SPR 裝置紀錄鍵結行為。在經過特定計算公式求出結合常數與解離常數後，二者值之比可得出親和性參數。嘗試找出親和能力數值與神經毒性間之關聯性，尋求細胞培養神經毒性資料與分子階層生物物理模式間之關聯性，以對 A β 細胞膜間交互作用之機制與 A β 誘發之神經毒性作進一步之探討與了解。

英文摘要

β -amyloid peptide (A β), the principal protein component of senile plaques in Alzheimer's disease (AD), plays an important role in neurotoxicity responsible for AD. Peptide structure and aggregation state are important in toxicity. However, the exact structure of the toxic form of the peptide and the mechanism by which it interacts with a cell to cause toxicity are unknown.

This research was set out to use surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy for the direct, real time observation of A β -membrane interaction. Via analyzing kinetic and equilibrium data obtained from SPR measurement, along with results from conventional biophysical and spectroscopic techniques as well as cell culture-based biological activity experiments, we will then construct a model, on a mechanistic/molecular level, of the interactions of A β -cell interaction, and seek for the link between biological toxicity and molecular/biophysical mechanisms of Alzheimer's disease. We believe the results from this proposed research should lead to better understanding of membrane-amyloid peptide interactions that result in biological activity and further facilitate the development of new strategies/compounds to prevent amyloid protein (especially A β)-induced neurotoxicity.

計畫緣由與目的

至少十六種以上與人類有關之蛋白質由於進行不正常地摺疊(misfold)而導致一種稱為 amyloid fibril 之物質生成及身體上之病變。這些蛋白質雖無相似之序列及功能；且在臨床、病理、及生物化學上，這些疾病並不直接相關且各具有其獨特之特性。然而這群疾病卻具有相同的發生機制；且對造成這群疾病之 amyloid 蛋白質而言，卻都能自我聚集(self-aggregate)成具有獨特二級結構(secondary structure) β -摺疊板(β -pleated sheet)之穩定 fibrils。導致阿滋海默症(Alzheimer's Disease)之 $A\beta$ 即為此蛋白質族群中相當重要之一種 (Kelly 1998; Lansbury 1999)。

越來越多的文獻證實細胞膜的存在之於 $A\beta$ 聚集現象的重要性；一些結果發現 $A\beta$ 能夠與磷脂質類細胞膜作用且此作用為與聚集狀態有關；許多研究團隊提出了一些解釋 $A\beta$ 毒性作用之可能的分子機制，但目前仍無統一之說法。一些研究結果發現，降低細胞膜中膽固醇及神經節糖苷之含量(Wang, Rymer et al. 2001)；或經由 Congo red 或 rifampicin 與 $A\beta$ 作用以降低 $A\beta$ 與細胞膜間之疏水性交互作用 (hydrophobic interaction) (Burgevin, Passat et al. 1994; Lorenzo and Yankner 1994; Tomiyama, Asano et al. 1994; Sadler, Smith et al. 1995)等，皆可減輕神經毒性。

由上述之證據可知， $A\beta$ 與細胞膜間交互作用的確與 $A\beta$ 誘發之神經毒性有密不可分之關係。因此，對於此交互作用之深入了解必有助於對 $A\beta$ 導致之毒性機制之進一步認識。表面電漿共振光譜技術被應用於研究生化分子間之辨識及了解分子間之交互作用。此技術之重要優點為：不需標記物質、不需破壞被測物之特性，即為一非破壞性分析法、樣品不需經過複雜的備製步驟、與可進行即時分析。表面電漿共振光譜技術之結果提供了兩作用物質間之親和性參數或平衡常數與反應動力學的訊息(Myszka 2000; Rich and Myszka 2000; McDonnell 2001; Homola, Dostalek et al. 2002)。此研究計畫之目標在於了解 $A\beta$ 胜肽與細胞膜間之交互作用。而此 $A\beta$ 胜肽與細胞膜間之交互作用已知與胜肽聚集和細胞毒性具密不可分之關係。透過對此交互作用分子層次機制之瞭解將有助於闡釋 $A\beta$ —細胞膜交互作用於愛滋海默症中 $A\beta$ 胜肽神經毒性所扮演的角色。

結果與討論

聚集狀態 amyloid 物種之備製

將備製兩種不同聚集狀態之 $A\beta$ 物種：採用 DMSO (a)新鮮備製之單體物種 (fresh monomeric species)；(b)僅含 fibril 聚分子物種之樣品 (fibril-containing species)。

模型細胞膜—磷脂質囊(lipid vesicle)微脂粒之備製

取 DPPC (L- α -Dipalmitoyl phosphatidylcholine) 0.38g, 使用氮仿: 甲醇體積比 2:1 比例去溶解 DPPC, 溶解後放置 50 °C 水浴, 並利用氮氣吹乾。再加入事先水浴過的 PBS 10 毫升, 進行超音波陣盪 20 分鐘, 形成乳白色狀態裝入離心管中。在急速低溫以及 50 °C 水浴反覆五次製造 MLV (multilamellar vesicle), 液態氮 10 分鐘 → 50 °C 水浴 10 分鐘 → 液態氮 10 分鐘 → 50 °C 水浴 10 分鐘 → 液態氮 10 分鐘 → 50 °C 水浴 10 分鐘。超音波乳化 30 分鐘, 之後在使用 0.22 μ m 過濾膜過濾五次。每次配製好的 liposome 可以存放在 4°C 大約 30 天。而 POPG 的方法與 DPPC 相同。

SPR chip 金片改質

用無水酒精以及氮氣清洗金片三次, 取避光瓶裝約 20 毫升 MHA, 浸入金片瓶外再用鋁箔紙包覆, 浸泡一天後用無水酒精和氮氣清洗。將金片泡置 5 毫升 0.1 M TFAA (Trifluoroacetic anhydride) 以及 5 毫升 0.2 M Triethylamine 中二十分鐘。再利用二氯甲烷沖洗氮氣吹乾, 在泡入 Brij-76 (polyethylene glycol-octadecyl ether) 10 毫升溶液中加入催化劑 DMAP (4-Dimethylaminopyridine) 三十分鐘, 再用無水酒精沖洗。

表面電漿共振 (SPR) 實驗相關處理

本研究擬利用表面電漿共振光譜技術對 A β 與細胞膜間之鍵結或交互作用進行及時觀測。細胞膜與 amyloid 蛋白質間之鍵結動力學行為是藉由 SPR 光譜來決定的。表面電漿共振光譜技術被應用於研究生化分子間之辨識 (biomolecular recognition) 及了解分子間之交互作用。實驗所採用的策略如下: (1) 在 SPR chip 金表面覆蓋上雙層 (bilayer) 磷脂質模式細胞膜, 探討在不同聚集狀態下 A β 物種之鍵結行為; (2) 先在 SPR chip 金表面接上 avidin 分子, 再覆蓋上 biotinylated 之磷脂質雙層 (bilayer-liposome) 後, 探討在不同聚集狀態下 A β 物種之鍵結行為。一如之前所述, 採用表面電漿共振光譜技術之故乃在利用其高靈敏度、快速、即時、不需標記及破壞分析物等之優點。實驗一開始先流通 PBS 進行 baseline 量測, 當訊號穩定後跑, 之後流通 liposome buffer (liposome: buffer = 1:9) 使金片上佈滿 liposome bilayers; 當達到訊號最高值且穩定的時候, 也就是達到 liposome 對金片之最大覆蓋率, 再流通 PBS 使金片上非專一性吸附的 liposome 脫附, 訊號達到平穩之後再流通我們要測定之 peptide, 同理, 當訊號達到一個最高值且平穩的時候, 再流通 PBS 使 peptide 從 liposome bilayers 上脫附, 當訊號達到一個平穩的時候實驗就完成了。

SPR 相關之動力學分析如下

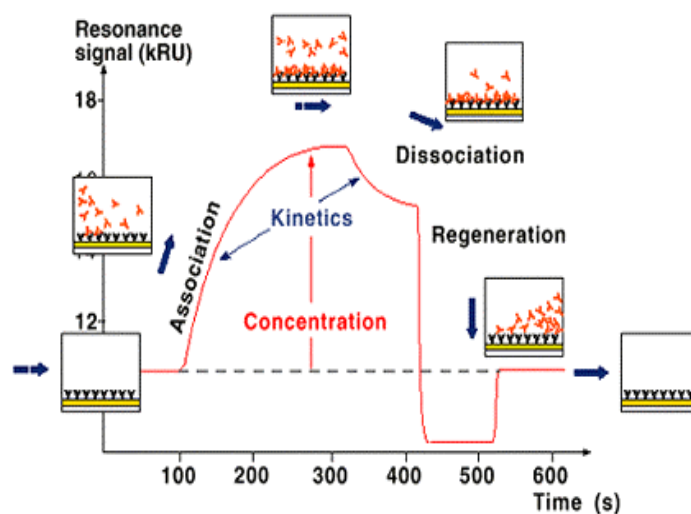


Figure 1

SPR 相關之動力學分析如下：



Probe 是 lipid bilayer 上的覆蓋率，Target 是 A β ，kon 和 koff 表示吸附速率常數和脫附速率常數。

$$\frac{d}{dt} \text{【P} \cdot \text{T】} = k_{on} \text{【Probe】} \text{【Target】} - k_{off} \text{【P} \cdot \text{T】}$$

$$\frac{d}{dt} \Gamma(t) = k_{on} \text{【} \Gamma_M - \Gamma(t)\text{】} C_o - k_{off} \Gamma(t)$$

$\Gamma(t)$ 表示 【P · T】 的濃度， Γ_M 是金箔上的最大覆蓋率， C_o 是 A β 的進料濃度。

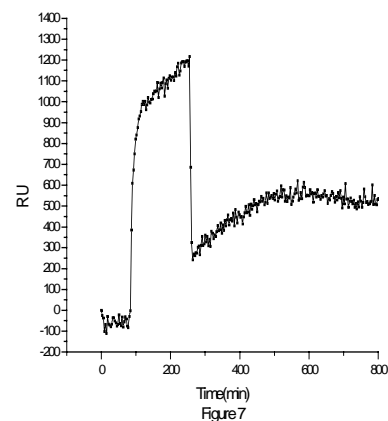
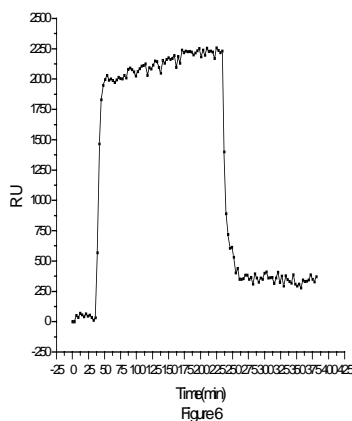
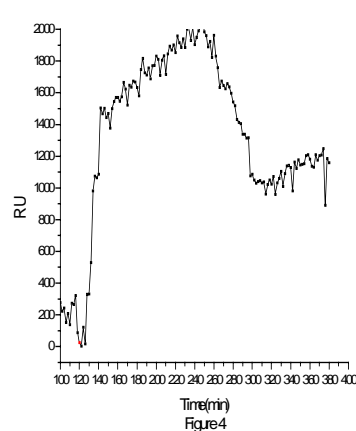
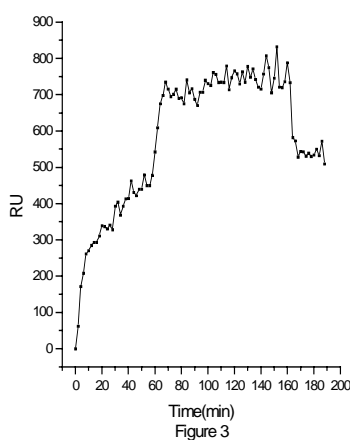
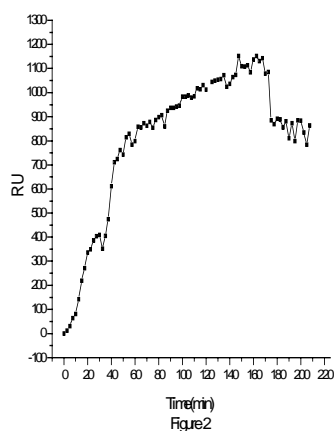
SPR 的圖形是由時間對 RU (1 RU = 0.0001 度) 作圖，所以套用我們假設之一階動力學模型可以求得 kon (吸附常數) 以及 koff (脫附常數)，當我們求得吸附和脫附常數後，便可以利用兩者來求得 peptide 對 liposome 之親和力，理論上，不同的 peptide 與 liposome 應該會有不同的親和力。

我們由 Table 1 可以得知每組實驗的吸附常數以及脫附常數，實驗的條件：我們都把 peptide 培養控制在 4 天之後再進行實驗，濃度我們調控在 20 μ M。不過實驗的再現性不高，圖 2 到圖 6 都是相同的條件下去進行實驗可是求得的親和力卻有很大的差異，特別是第一組第六組，由圖形看可以知道在我們進行脫附階段的時候，SPR 的訊號下降的程度已經快要達到還沒有進行吸附的程度了，這點在第二、三、四、五和六組的比較有著非常明顯的差別，第二、三、四和第五組的脫附程度頂多也才到達吸附程度的一半。第七組的 A β 是放置 7 天過後的 peptide 而我們之

前做的幾組都是培養未超過 4 天之 peptide，由吸附常數可以觀察而知第七組的 kon 是最大的，但是由於第七組的脫附常數跟其他幾組比也不低，所以其親和力並不是最高的。而第六組知所以最高是由於其相當快就達到 peptide 對 liposome 之最大覆蓋率，所以其 kon 非常的大，導致於有最高之親和力。第八組是由新鮮配製的 A β 與 POPG 的模型細胞膜進行實驗，所得到的 sensorgram 分析後得到的吸附常數以及脫附常數都遠小餘其他組，自然親和力也就是最小的了。

Table 1

	Kon	Koff	Affinity
Figure 2	3108.51	0.1441	21573.11
Figure 3	3288.87	0.3206	10258.49
Figure 4	3597.88	0.0351	102503.9
Figure 5	1051.03	0.0470	22362.54
Figure 6	6230.83	0.1774	35123.10
Figure 7	2120.20	0.37817	5606.493



A β 在相同條件下對不同的模型細胞膜有著不同的親和力，A β 對於不帶電之DPPC有著較高的親和力，相對於DPPC，對於POPG有著較小的親和力，這有可能是由於A β 與模型細胞膜的交互作用，並不是由靜電作用所主導，因為POPG是帶負電的微脂粒，而DPPC是不帶電的微脂粒，所以當模型細胞膜表面帶負電，會有較小的親和力。另外當聚集七天與聚集四天的A β 對於模型細胞膜之交互作用力也有明顯的不同，聚集七天的A β 對於聚集四天的A β 有著較高的親和力。

參考資料

- Burgevin, M. C., M. Passat, et al. (1994). "Congo red protects against toxicity of beta-amyloid peptides on rat hippocampal neurones." Neuroreport **5**(18): 2429-32.
- Homola, J., J. Dostalek, et al. (2002). "Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk." International Journal of Food Microbiology **75**(1-2): 61-69.
- Kelly, J. W. (1998). "The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi- step assembly pathways." Curr Opin Struct Biol **8**(1): 101-6.
- Lansbury, P. T., Jr. (1999). "Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3342-4.
- Lorenzo, A. and B. A. Yankner (1994). "Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12243-7.
- McDonnell, J. M. (2001). "Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition." Current Opinion in Chemical Biology **5**(5): 572-577.
- Myszka, D. G. (2000). "SPR biosensors as biophysical research tools." Faseb Journal **14**(8): A1511-A1511.
- Rich, R. L. and D. G. Myszka (2000). "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis." Current Opinion in Biotechnology **11**(1): 54-61.
- Sadler, II, D. W. Smith, et al. (1995). "Sulphated compounds attenuate beta-amyloid toxicity by inhibiting its association with cells." Neuroreport **7**(1): 49-53.
- Tomiyama, T., S. Asano, et al. (1994). "Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid beta protein in vitro." Biochem Biophys Res Commun **204**(1): 76-83.
- Wang, S. S., D. L. Rymer, et al. (2001). "Reduction in cholesterol and sialic Acid content

protects cells from the toxic effects of Beta -amyloid peptides." J Biol Chem
276(45): 42027-34.

計畫成果自評

本研究藉 SPR 對不同聚集狀態 A β 物種與細胞膜間之交互作用有定量上的了解。未來研究中擬就不同 A β 配製溶劑系統(如 TFA 或 TFE 等)、細胞膜添加膽固醇與神經節糖苷(ganglioside)或者相異膽固醇或神經節糖苷之組成、以及不同胜肽序列之 A β 進行實驗。此外在相同的條件下進行相應之細胞活性分析實驗。