

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 探討主宰阿滋海默症之毒性機制--阿滋海默症蛋白質與細胞膜間交互作用之研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2214-E-002-033-

執行期間：93年08月01日至94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

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 23 日

# 探討主宰阿滋海默症之毒性機制--阿滋海默症蛋白質與細胞膜間交互作用之研究

(1/2)

計畫編號：NSC 93-2214-E-002-033

王勝仕

國立台灣大學化學工程學系

## 摘要

本研究利用電位敏感性染劑配合螢光光度計，量測細胞膜偶極電位受不同實驗條件變化之影響；並進一步藉由觀察細胞膜偶極電位之改變，對蛋白質與生物細胞膜間之交互作用機制加以探討。嘗試尋求分子階層生物物理模式，以對 A $\beta$  與細胞膜間交互作用之機制作深入之探討與了解。

## 計畫緣由與目的

大約有二十種與人類有關之蛋白質因進行不正常地摺疊(misfold)而生成一種稱為 amyloid fibril 之物質並導致身體上之病變。這些蛋白質相互間在序列(sequence)及功能方面並無相似之處；此外，在臨床、病理、及生物化學方面，這些疾病並不直接相關且各具有其獨特之特性。然而，重要的是，這群疾病不僅具有相同的發生機制，且造成這群疾病之各 amyloid 蛋白質，卻都能自我組合(self-assemble)或自我聚集(self-aggregate)成具有獨特  $\beta$ -摺疊板( $\beta$ -pleated sheet)等二級結構(secondary structure)之穩定 fibrils。導致阿滋海默症(Alzheimer's Disease)之蛋白質 A $\beta$ ，即為這些蛋白質中族群中相當重要之一種 (Kelly 1998; Lansbury 1999)。

大腦皮層(cerebral cortex)中不可溶解的老人斑(senile plaque)之逐漸凝聚(progressive deposition)被視為是阿滋海默症的一個重要病理上之標記(pathological hallmark)；一般相信不可溶解之老人斑或 senile plaque 是由 amyloid fibrils 聚集而成，而此些 amyloid fibrils 即為一種稱為  $\beta$ -amyloid 胜肽(又稱為 A $\beta$ )之蛋白質成份所構成。A $\beta$  是一分子量約為 4.3 kD 之小蛋白質單體分子(monomer)，在經過一連串複雜反應後，能自我聚集成約為數個微米(micron)大之 fibril 分子，而幾個 fibril 分子則結合形成稱為 senile plaque 之硬塊。一般發現，環繞在此些 senile plaque 硬塊周圍之腦神經細胞(neuron)皆會經歷神經退化(neurodegeneration)過程而死亡 (Selkoe 1994)。雖然由遺傳學(Genetics)之研究(Kimberly et al. 2000)與體外毒性(in vitro toxicity)實驗之結果(Seilheimer et al. 1997; Hartley et al. 1999; Ward et al. 2000)得知，A $\beta$  在阿滋海默症病理學(pathogenesis)上具有相當程度之重要性；然而由此 A $\beta$  誘發的神經毒性(neurotoxicity)與神經細胞死亡之分子階層機制則尚未完全清楚。

關於 amyloid 蛋白質(包含 A $\beta$ )與細胞膜間之交互作用，近來已被視為在 amyloidogenic 疾病發生機制上扮演一相當重要之角色。整體而言，過去文獻研究之方向不外致力於交互作用與 A $\beta$  之聚集作用的關係，以及交互作用在神經毒性所扮演的角色。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。相關的結果重點分別為：(1)細胞膜組成成份物質如膽固醇(cholesterol)與神經節糖苷(ganglioside)能改變 A $\beta$  對細胞膜之親和性(affinity)(Choo-Smith et al. 1997; Avdulov et al. 1999; Matsuzaki and Horikiri 1999)。(2)肽與細胞膜間之結合(association)取決於可獲得疏水性表面之含量多寡(Kremer et al. 2000)。(3)肽一旦與細胞膜結合，負電性磷脂質類、膽固醇、與神經節糖苷被發現能提升  $\beta$ -sheet 之含量及 A $\beta$  聚集反應速率(Choo-Smith et al. 1997; McLaurin et al. 1998; Avdulov et al. 1999; Del Mar Martinez-Senac et al. 1999; Matsuzaki and Horikiri 1999)。(4)不論體內或體外上，研究發現可溶解膽固醇含量和/或其生化合成之改變能影響 APP 之正常 processing：抑制膽固醇之合成會降低 A $\beta$  之生成(Howland et al. 1998; Simons et al. 1998; Frears et al. 1999)。

雖然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。幾個在 A $\beta$  與細胞作用後與毒性有關聯的細胞反應(cellular response)為鈣離子恆定性之改變(destabilization of calcium homeostasis)、細胞膜之去極化(depolarization)、因自由基(free radical)之產生而造成細胞膜通透性(permeability)之上升、細胞膜流動性之改變、鉀離子通道(potassium channel)之阻擋或功能喪失、細胞膜整體性之直接破壞等。

一些研究結果發現，藉由改變細胞膜之靜電電位(electrostatic potential)(Hertel et al. 1997)；或降低細胞膜中膽固醇及神經節糖苷之含量(Wang 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 et al. 1994; Lorenzo and Yankner 1994; Tomiyama et al. 1994; Sadler et al. 1995)，皆可減輕神經毒性。另外一些研究者則觀察到 A $\beta$  與磷脂質細胞膜間之交互作用是與靜電作用力有關(Terzi et al. 1994; 1995; 1997)。在 circular dichroism、titration calorimetry、及 ultracentrifugation 等測量方法輔助下，研究人員發現磷脂質細胞膜之存在對於 A $\beta$  構形(conformation)在隨機團與  $\beta$ -摺疊片間之轉換(random coil-to- $\beta$ -sheet transition)有關，且磷脂質帶電性之改變之於 A $\beta$  之構形有相當程度的影響。當在帶負電荷之磷脂質細胞膜加入系統後，A $\beta$  之構形則幾乎全數以  $\beta$ -摺疊片呈現。(Terzi et al. 1994; 1995; 1997)。此外，研究者亦測試 A $\beta$  與磷脂質細胞膜之親合作用以及 A $\beta$  誘發之神經細胞毒殺性受改變細胞膜性質添加物質(如 phloretin、exifone)之影響(Hertel et al. 1997)，結果發現 A $\beta$  與細胞膜間之

交互作用是受非專一性交互作用(non-specific interaction)所主宰。諸如此類對真正 A $\beta$  與細胞膜間交互作用力模式之假說，例如：A $\beta$  與細胞膜間之交互作用否受細胞膜流動性(membrane fluidity)操控？此作用力是否為偶極-偶極間交互作用力(dipole-dipole interaction)？此作用力是否為純靜電作用力(electrostatic interaction)？皆尚未有定論，仍待更多的技術與實驗數據加以證明及了解之。

偶極電位(dipole potential)是一種與生物膜(如:細胞膜)有關的局部化電位(localized electrical potential)。此存在於生物膜間之偶極電位是源自於(1)生物膜中脂質分子(lipid molecule)偶極極性殘基(dipolar residues)之對齊排列(alignment)以及(2)介於水—脂質界面區域具方向性水分子之分子偶極(molecular dipole)(Brockman 1994; Clarke 2001)。近年來，許多與偶極電位測量相關之研究中，多採用一些例如 RH421 或 di-8-ANEPPS 等具電位高敏感性之 styrylpyridinium 染劑(voltage-sensitive styrylpyridinium dye)；此類染劑之 chromophore 部位可與脂質細胞膜之脂質頭部位(lipid headgroup)結合(Clarke 2001)。此類電位高敏感性之 styrylpyridinium 染劑乃是應用其 pKa 之改變或螢光激發光譜(fluorescence excitation spectrum)之偏移(shift)會隨局部電位(local electric field)變化之原理間接地來量測生物膜中偶極電位之變化(Clarke 2001)。

雖此偶極電位對疏水性離子(hydrophobic ion)穿越細胞膜之程序(translocation)之影響性已廣為知(Ando et al. 1984)；然而，此偶極電位在大部分牽涉巨分子物質(macromolecule)與脂質雙層(lipid bilayer)之生化程序(biological processes)所扮演的角色在最近才開始為人所注意。過去的研究結果顯示，偶極電位大小之變化會影響胜肽或蛋白質與模式細胞膜(model membrane)間之交互作用，此類之作用包括：(1)細胞膜與訊息胜肽(signal peptide)間交互作用以及訊息胜肽構形(conformation)改變(Cladera and O'Shea 1998; Voglino et al. 1998)；(2)免疫缺陷病毒融合胜肽(immunodeficiency virus fusion peptide)其融合誘導能力(fusion induction capability)及其與細胞膜之交互作用(Cladera et al. 1999)；(3)短桿菌素(gramicidin)與細胞膜之交互作用(Rokitskaya et al. 1997; Shapovalov et al. 1999)；(4)分子偶極對人類表皮穿透性之影響(Cladera et al. 2003)；以及(5)磷脂酶 A(phospholipase A)與細胞膜之交互作用等(Maggio 1999)。由上述可知，藉由觀察偶極電位之改變及變化，可提供吾人對胜肽或蛋白質與生物細胞膜間之交互作用機制之進一步了解。

## 結果與討論

由之前的文獻回顧中，我們可以得知細胞膜表面、或是細胞膜之組成對於類澱粉  $\beta$  蛋白質的毒性機制具有相當大的影響；而其他的研究提出了細胞膜的偶極性會影響到細胞膜上的兩性蛋白質。所以在此提出一個可能影響類澱粉  $\beta$  蛋白質

與細胞膜間交互作用的因素—細胞膜的偶極電位；並且在研究中進一步探討細胞膜組成成分對細胞膜偶極電位之影響。

為了研究細胞膜上的電位在類澱粉  $\beta$  蛋白質與細胞膜間交互作用上所扮演的角色，於本研究中採用一種廣為使用的脂醇(sterol)，phloretin，來降低細胞膜的偶極電位；而 6kc(6-ketocholestanol)則被用來增加細胞膜的偶極電位。

欲探測細胞膜偶極電位的變化，本研究中採用了雙波長螢光比值檢測法(dual-wavelength ratiometric fluorescence method)，利用加入各種化學物質引起細胞膜電位變化，再運用電位敏感性染劑來標定細胞膜在不同物種影響下之電位變化。此電位變化可藉由在固定 emission wavelength 下激發光譜(excitation spectra)中，螢光讀值在 460nm 與 520nm 的比值 R 表示。由實驗觀察得知，於固定 emission wavelength 下，在可降低細胞膜偶極電位化學物種(例如：phloretin)之激發光譜(excitation spectra)中，會發現紅移現象(red shift)；而可增強細胞膜偶極電位物種(像是：6kc)之激發光譜中，則會呈現藍移現象(blue shift)。而藉由此兩種產生不同效應的物種為基準，使得定義出的 R 值具有相對應的減小及增大結果；如此可免去許多確切探測偶極電位的複雜方法，僅藉由觀察 R 值變化即可推知某物種對細胞膜偶極電位的影響。

上述兩種最具代表性的影響偶極電位物種，並不僅僅改變偶極電位；也會改變細胞膜的表面電位(surface potential)、穿膜電位(transmembrane potential)···等；但由於所定義的 R 值對此兩種電位並無相對之對應性，而偶極電位對於 R 值之對應性則非常顯著；故在此實驗中僅選定此雙波長螢光比值檢測法來測定細胞膜偶極電位的變化。

首先，先使用微脂粒(liposome)進行初步的實驗，以確定 phloretin 與 6kc 能夠確實的作用在本實驗的系統中。在初步的實驗中，以 DPPC(dipalmitoyl phosphatidyl choline)配置 SUV 大小的微脂粒，加入適量的 phloretin 與 6kc，以 2:1 的比例混合，先置入恆溫培養箱中靜置 30 分鐘，再加入 di-8-ANEPPS(1-(3-sulfonatopropyl)-4-[[2-(di-n-octyl-amino)-6-naphthyl]vinyl]-pyridinium betaine)之電位敏感性染劑，最後靜置於恆溫培養箱中 2 小時，再以螢光光度計測得在 emission wavelength 580nm 下之激發光譜(圖 1)；所得之 R 值如圖 2。

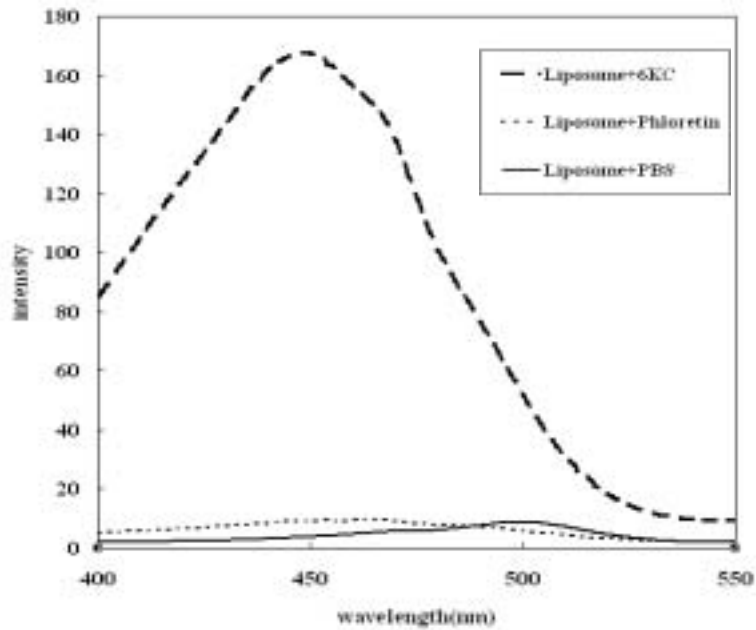


圖 1 微脂粒與 6kc 及 phloretin 之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM、6kc 及 phloretin 濃度為 3mM；PBS 為 Control 組，即 Liposome 加入 PBS。(6kc 及 phloretin 為溶解在甲醇中)

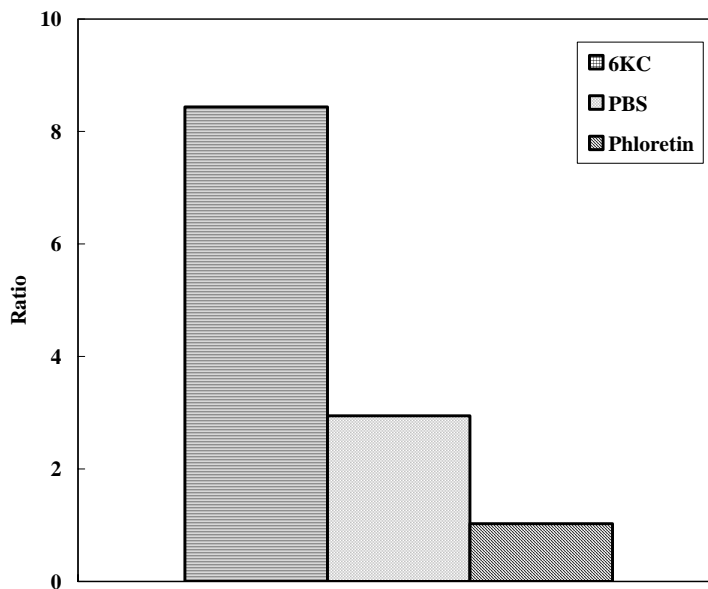


圖 2 微脂粒與 6kc 及 phloretin 之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM、6kc 及 phloretin 濃度為 3mM；PBS 為 Control 組，即 Liposome 加入 PBS。(6kc 及 phloretin 為溶解在甲醇中)

由初步的實驗發現，相對於對照組(不加入其他物質，僅加入原微脂粒所用之

溶劑 PBS)時，6kc 與 phloretin 皆造成 R 值顯著的增加與下降；所以此兩種物種確定可使用於本實驗系統。而在實驗過程中，發現隨著不同的靜置時間，其 R 值也會產生相對應的變化，並且影響明顯；為了找出實驗的最適靜置時間，故重新設計實驗，希望可以找到靜置時間對 R 值的影響。

針對靜置時間的影響之實驗步驟如下：配置足量的微脂粒，並將 6kc、phloretin 與 PBS 分別和微脂粒混合均勻後，靜置於恆溫培養箱，並控制此段靜置時間分別為 30 分鐘、4 小時、及 10 小時；接著，將染劑(di-8-ANEPPS)加入，混合均勻後，同樣將其靜置於恆溫培養箱中經過兩小時的靜置時間，再以螢光光度計測得分別之激發光譜(如圖 3、4、及 5)，並計算出其 R 值(如圖 6)

由實驗結果顯示，第一段靜置時間雖然對於 6kc 及 phloretin 的激發光譜有明顯的影響，但從 R 值之觀點來看，phloretin 導致之 R 值變化幅度不大；而即使 6kc 的 R 值，僅具一定程度的變化；但由於其 R 值本來就偏高，所以相對的變化率也就不甚明顯。此外，PBS 不管激發光譜或是 R 值變化都不大，也符合了對照組不會有所影響的觀點。

由實驗結果發現第一段靜置時間對 R 值的變化並不大，所以在之後的實驗可以選取一長一短的第一段靜置時間，以重複確定此部分實驗結果。

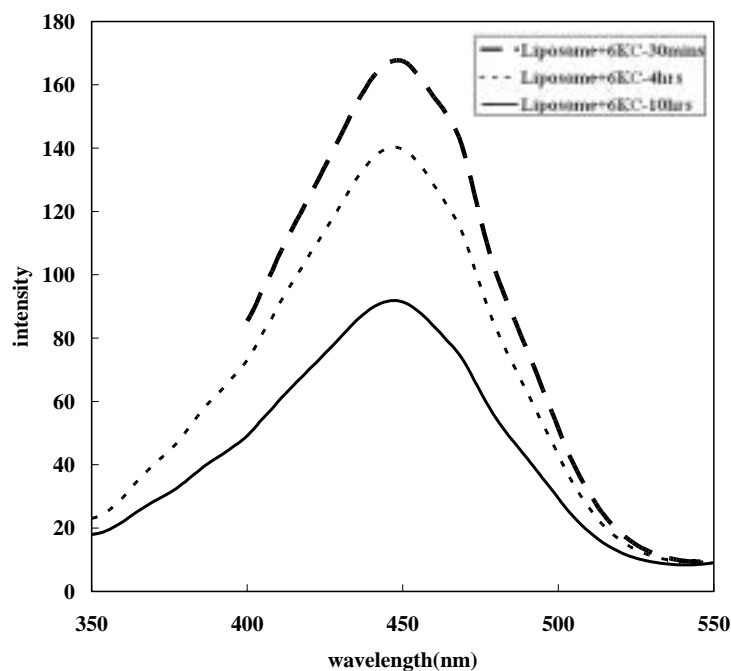


圖 3 微脂粒與 6kc 在不同時間混合靜置後，再加入染劑靜置第二段時間，之後使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV

大小，濃度為 1.035mM、6kc 濃度為 3mM。(6kc 為溶解在甲醇中)

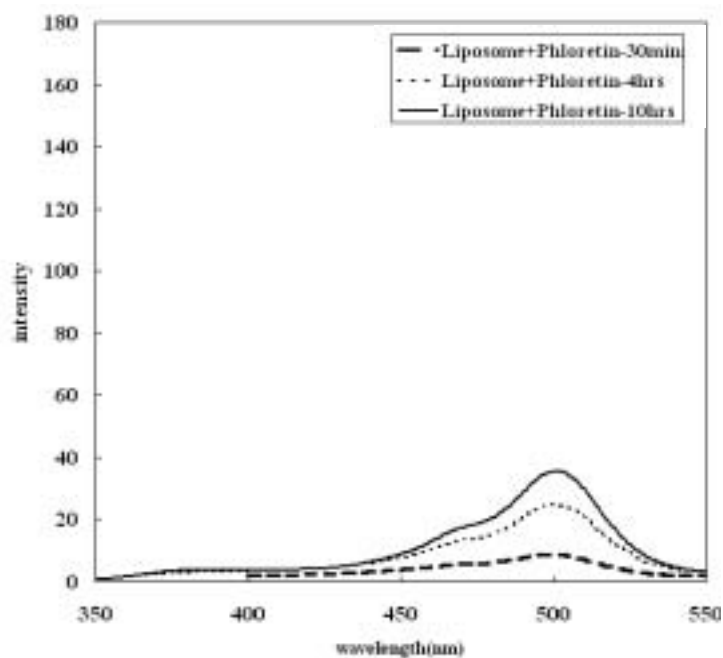


圖 4 微脂粒與 phloretin 在不同時間混合靜置後，再加入染劑靜置第二段時間，之後使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM、phloretin 濃度為 3mM。(phloretin 為溶解在甲醇中)

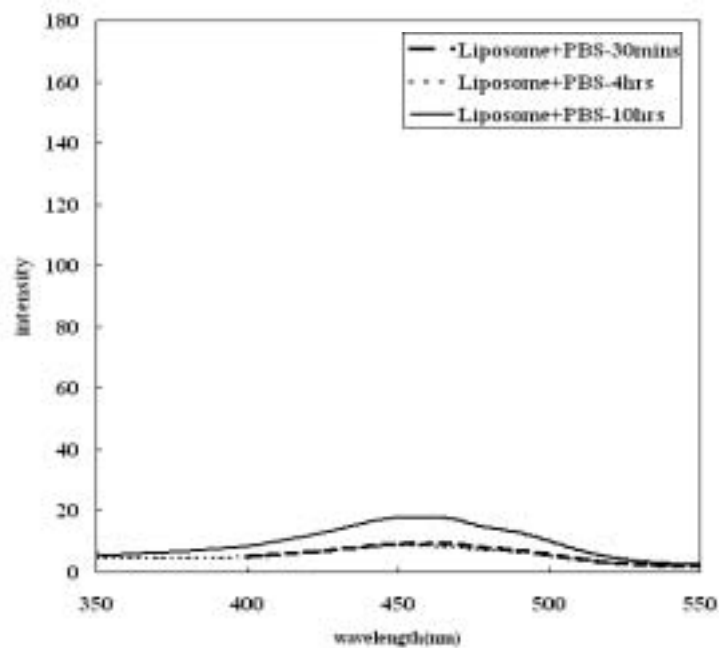


圖 5 微脂粒與 PBS 在不同時間混合靜置後，再加入染劑靜置第二段時間，之後使



用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM ；PBS 為 Control 組，即 Liposome 加入 PBS。

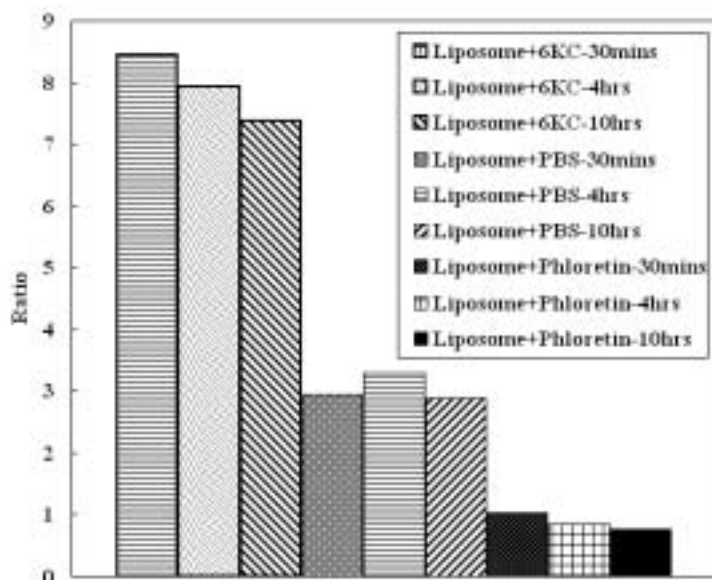


圖 6 微脂粒與 6kc、phloretin 及 PBS 在不同時間混合靜置後，再加入染劑靜置第二段時間，之後使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM。(6kc 及 phloretin 為溶解在甲醇中)

關於靜置時間對 R 值的影響，實驗步驟如下：配置足量的微脂粒，並將 6kc、phloretin 與 PBS 和微脂粒混合均勻後，靜置於恆溫培養箱，並固定此段靜置時間為 30 分鐘(後文中以  $t_1$  代替)；緊接著，將染劑(di-8-ANEPPS)加入，並將其再靜置於恆溫培養箱中經過第二段靜置時間(後文中以  $t_2$  代替)，以螢光光度計測得隨著不同  $t_2$  所得的激發光譜(如圖 7、8、9)；並計算出 R 值隨著  $t_2$  的變動(如圖 10)。

由實驗結果可以發現， $t_2$  對 R 值的影響是相當明顯的：在長時間的情況下，各種不同特性的物種對 R 值的影響都趨向一個平衡穩定值；像是 6kc 此類會使 R 值增大的物種就會隨著  $t_2$  的增加而使 R 值趨於一個最大值；反之，像是 phloretin 這類會減小 R 值的物種則是趨向一個最小值。以此觀之，之後的實驗設計在  $t_1$  的選定並不重要，重要的是  $t_2$  最好選擇較長的時間點，因為除了時間長會得到越大的 R 值差異外，在短時間的測定時可由圖 4-2-8 發現其變動性很大，所以在測試未知物種時，選擇較長的時間也會更加容易分辨出其特性。

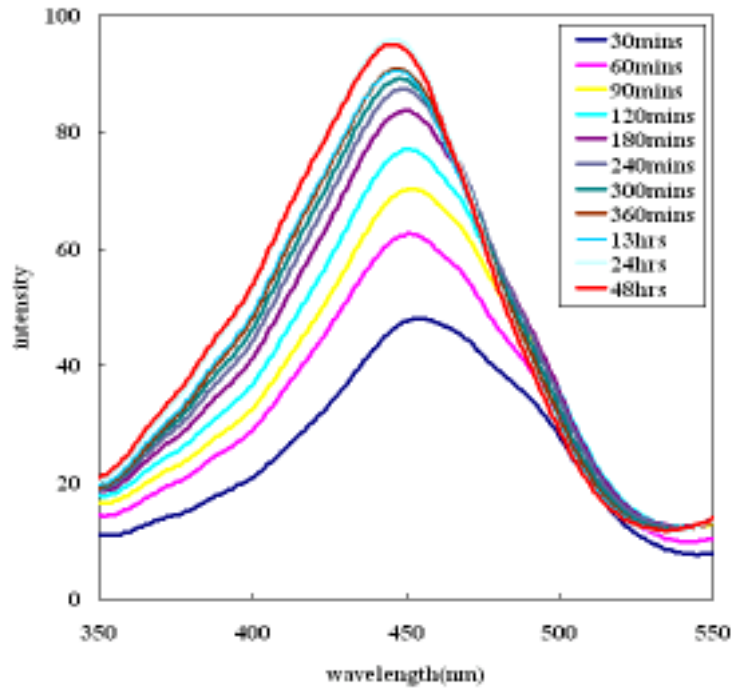


圖 7 微脂粒與 6kc 在混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 濃度為 3mM。(6kc 為溶解在甲醇中)

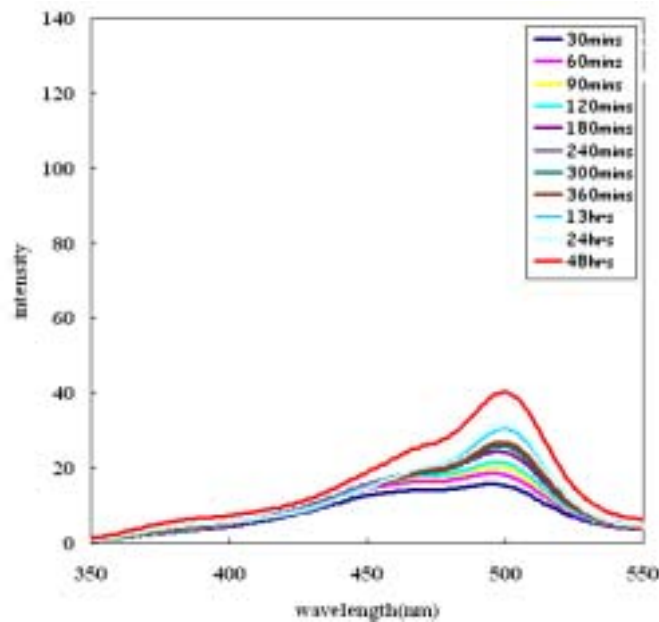


圖 8 微脂粒與 phloretin 在混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，phloretin 濃度為 3mM。(phloretin 為溶解在甲醇中)

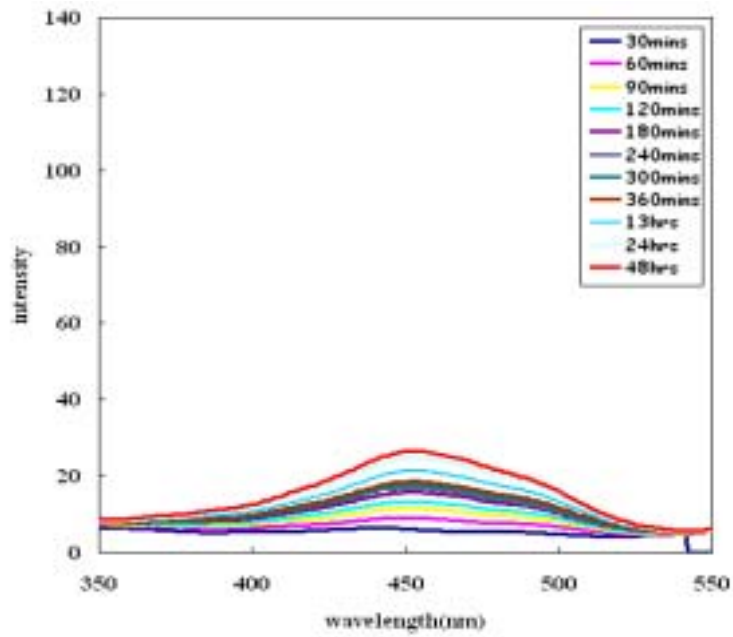


圖 9 微脂粒與 PBS 在混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM。

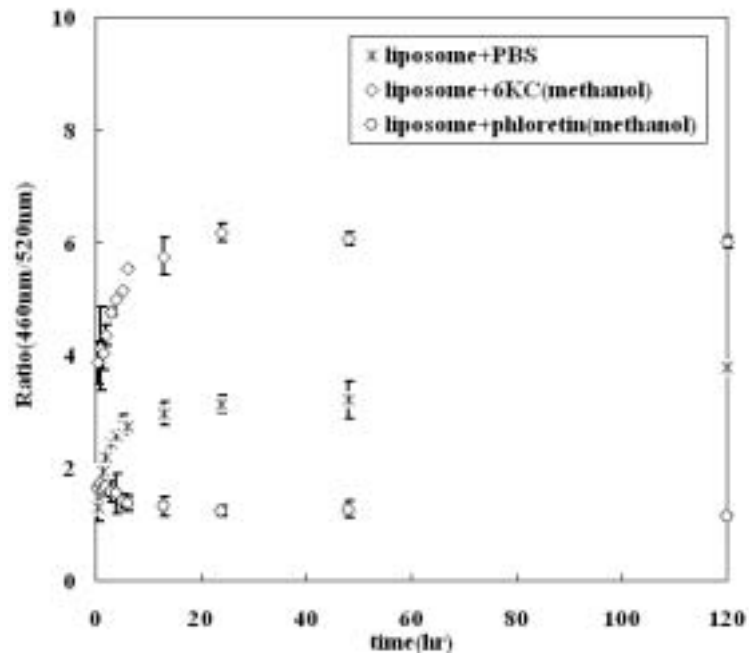


圖 10 微脂粒與 6kc、phloretin 及 PBS 分別混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；

微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM。(6kc 及 phloretin 為溶解在甲醇中)

除了  $t_2$  的影響外，實驗中亦探討 6kc 及 phloretin 初始溶劑對 R 值之影響(如圖 11、圖 12 及圖 13)。由於此 R 值的改變不見得是因為溶劑本身的影響，有可能是溶解度不同所造成的結果，故之後的實驗設計仍然採取有較佳溶解度的溶劑。

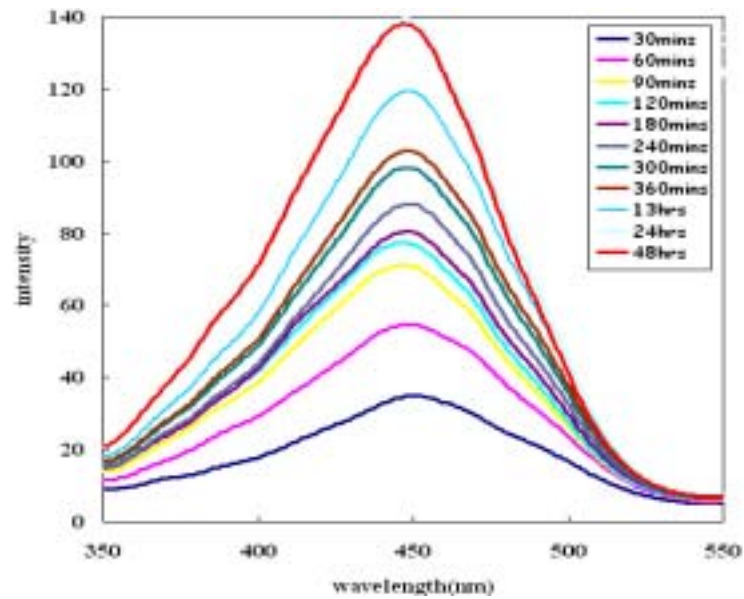


圖 11 微脂粒與 6kc 在混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 濃度為 3mM。(6kc 為溶解在 PBS 中)

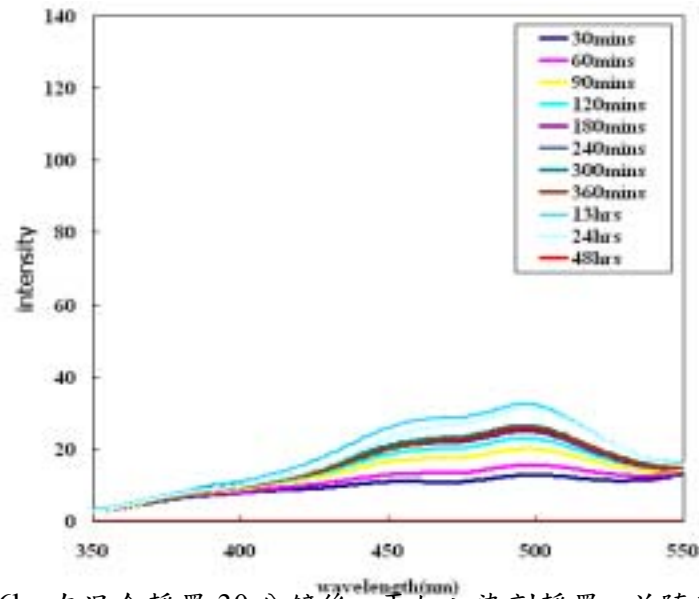


圖 12 微脂粒與 6kc 在混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之激發光譜；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 濃度為 3mM。(phloretin 為溶解在 PBS 中)

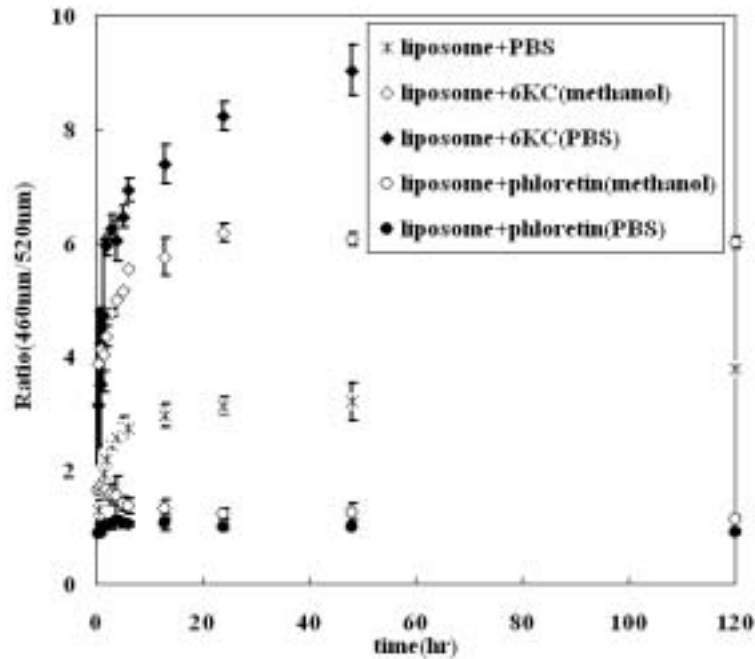


圖 13 微脂粒與 6kc、phloretin 及 PBS 分別混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 1.035mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM。(6kc 及 phloretin 為分別溶解在甲醇及 PBS 中)。

由上述的實驗決定實驗之基本條件如溶解溶劑、 $t_1$  及  $t_2$ ；為了能夠觀察到較為明顯的 R 值影響，所以選擇了固定  $t_1$  而仍隨著  $t_2$  以螢光光度計測量隨  $t_2$  變化之 R 值；其中，仍以甲醇作為 6kc 及 phloretin 的溶劑。

除了上述這些控制條件外，在本研究中還另外探討了微脂粒本身濃度對 R 值的影響；因為合成之微脂粒本身為球狀，而用來測量膜偶極電位變化的染劑是以嵌入的方式與微脂粒作用，更進一步影響其偶極電位；所以假設：微脂粒濃度提高，相對應的染劑用量應該也提升，如此所測得之 R 值才會實際地反映出該物種所造成的變化。

由上述之假設，進一步分別以不同濃度(0.5mM、1mM 及 2mM)的微脂粒，重複前述的實驗步驟，所得的結果如圖 14；由圖中可發現在相同的  $t_1$  及  $t_2$  下，高濃度的微脂粒會有較佳的 R 值變化，所以之後對於未知物種的性質測定，將採取 2mM 的微脂粒為主。

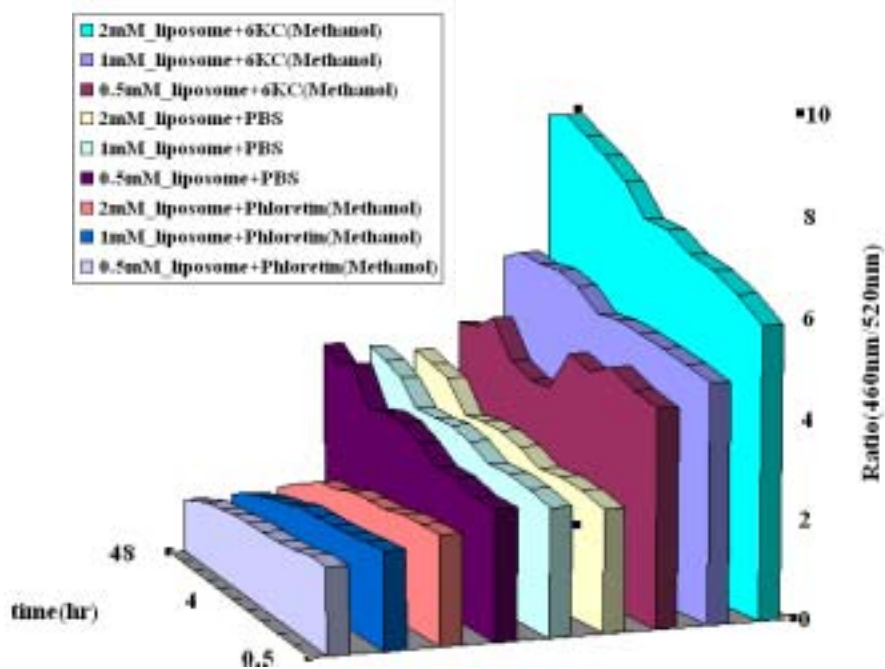


圖 14 微脂粒在不同濃度下(0.5mM、1mM 及 2mM) 分別與 6kc、phloretin 及 PBS 混合靜置 30 分鐘後，再加入染劑靜置，並隨著  $t_2$  使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM。(6kc 及 phloretin 溶解在甲醇中)。

經過上述的實驗可以決定實驗的基本條件：微脂粒濃度、溶劑、 $t_1$  及  $t_2$ ；而在考慮蛋白質與微脂粒作用需要較長的時間，並且希望能夠觀察到較為明顯的 R

值影響，所以選擇了 2 小時及 13 小時為實驗的  $t_1$ ；而  $t_2$  為 13 小時；仍以甲醇作為 6kc 及 phloretin 之溶劑；微脂粒濃度則選擇 2mM 為實驗用濃度。

在決定好所有控制條件後，一開始先測試類澱粉  $\beta$  蛋白質(A $\beta$  25-35)在本系統中是會對膜偶極產生增加或減少的影響。所以一方面經由加入新鮮備製及溶解於不同溶劑下(TFA 或 DMSO)的類澱粉  $\beta$  蛋白質(A $\beta$  25-35)代替原本 6kc 及 phloretin 所扮演的角色；另一方面仍然同時測量 6kc、phloretin、PBS、PBS(D)及 PBS(T)(即 PBS 中含有少部分的 TFA 或 DMSO，其比例等同於欲溶解類澱粉  $\beta$  蛋白質所用之劑量)分別與微脂粒混合後的 R 值作為對照(如圖 15)。

由實驗結果顯示，類澱粉  $\beta$  蛋白質(A $\beta$  25-35) 溶解在不同的溶劑對似乎影響並不大；而且類澱粉  $\beta$  蛋白質(A $\beta$  25-35)本身也沒有對 R 值產生變大或變小的趨勢(與添加 PBS 之對照組相比)。所以可以由實驗結果推論，新鮮備製(fresh)的類澱粉  $\beta$  蛋白質(A $\beta$  25-35)不論溶解於何種溶劑，本身並沒有改變細胞膜偶極電位的能力。除此之外， $t_1$  對 R 值的影響在  $t_2$  的拉長下，也產生了些微的影響；不過與整體之 R 值比較下，此改變並不重要，與之前實驗所得的結果吻合。

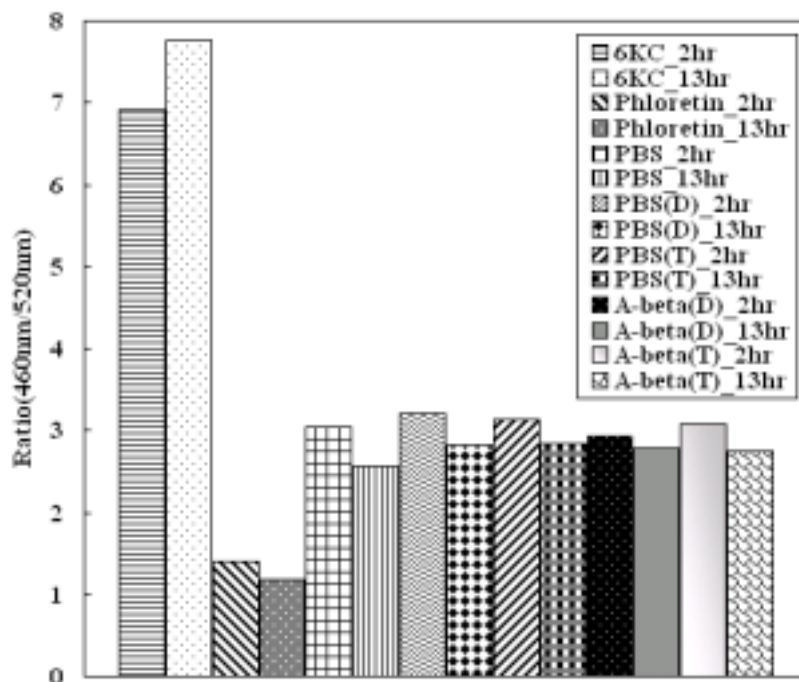


圖 15 微脂粒分別與 6kc、phloretin、PBS、PBS(T)、PBS(D)、A $\beta$ 25-35(T)、A $\beta$ 25-35(D) 混合靜置 2 小時或 13 小時後，再加入染劑靜置於恆溫培養箱中 13 小時，之後使用螢光光度計在 emissionwavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 2mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM，A $\beta$  25-35 濃度為 50 $\mu$ M，標示

(T)及(D)表示於配置過程中分別先溶於 TFA 及 DMSO 中(同第三章驗步驟所述)，之後符號亦同，將不再解釋。(6kc 及 phloretin 溶解在甲醇中)。

雖然新鮮備製的類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)本身並沒有影響細胞膜偶極電位的能力，但是隨著類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)的培養時間拉長，其構造會逐漸轉變，而此結構的轉變是否會改變細胞膜的偶極電位呢？為了要試驗此假設，於是又再試驗了類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)，並將其分為兩組，分別為新鮮備製(fresh)與備製後旋轉培養(rotation) 7 天(aged)，希望藉著旋轉培養時間的拉長而看出其對細胞膜偶極電位的影響，而其結果如圖 16。

由圖中可以看出即使拉長旋轉培養時間，類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)對 R 值似乎仍沒有顯著的改變(與對照組相比)；而這是否意味著類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)對 R 值就完全沒有影響呢？還是旋轉培養的時間仍然不夠長，而使得類澱粉 $\beta$ 蛋白質 A $\beta$ (25-35)本身的構造變化不夠完整？為了解決這個問題，於是繼續設計了之後的實驗。

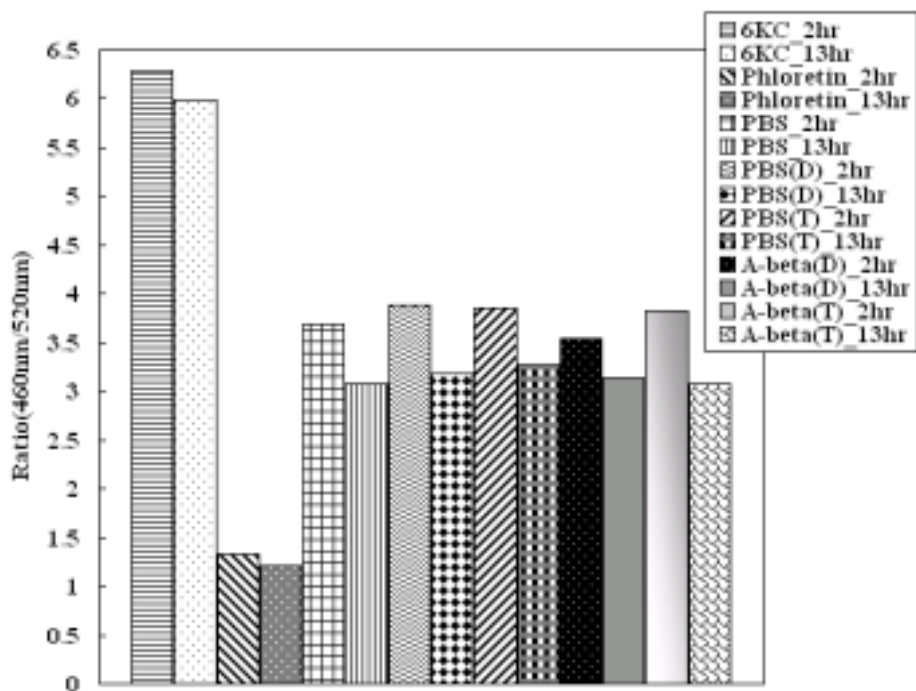


圖 16 微脂粒分別與 6kc、phloretin、PBS、PBS(T)、PBS(D)、A $\beta$ (25-35)(T)、A $\beta$ (25-35)(D) 混合靜置 2 小時或 13 小時後，再加入染劑靜置於恆溫培養箱中 13 小時，之後使用螢光光度計在 emission wavelength 為 580nm 情況下所得之 Ratio 圖；微脂粒為 SUV 大小，濃度為 2mM，6kc 及 phloretin 濃度為 3mM，A $\beta$  25-35 濃度為 50 $\mu$ M 並於製備後旋轉七天。(6kc 及 phloretin 溶解在甲醇中)。



由過去本研究室的結果顯示，細胞膜表面或是細胞環境的組成對於類澱粉  $\beta$  蛋白質與細胞膜的交互作用也有相當大的影響，其中又以膽固醇及神經節甘脂的存在會增加類澱粉  $\beta$  蛋白質中  $\beta$ -sheet 的成分及聚集速率；再配合上述實驗之結論，所以進一步探討微脂粒中膽固醇的存在，是否會影響類澱粉  $\beta$  蛋白質  $A\beta$  (25-35) 與微脂粒之 R 值變化。

實驗步驟如前面所述，選擇 2 小時及 13 小時為實驗的  $t_1$ ；而  $t_2$  為 13 小時；以甲醇作為 6kc 及 phloretin 的溶劑；而微脂粒濃度則選擇 1mM 及 2mM 為實驗用濃度；此外，在配置微脂粒的同時加入了 30% 的膽固醇(Cholesterol)；另外類澱粉  $\beta$  蛋白質  $A\beta$ (25-35) 皆備製了 fresh 及 aged 兩種不同的實驗組。因膽固醇本身就會增強細胞膜偶極電位，也就是使 R 值增大；可由觀察加入膽固醇後，各物種的 R 值皆會明顯增加證實。為了減去膽固醇本身對 R 值所造成的干擾，在此定義出一個比值(公式如下)：為對照組所測得之 R 值減去加入某物種所測得之 R 值，再除以對照組之 R 值，最後乘以 100%；而藉由這樣的定義，可以比較出，實際上各物種實際對 R 值的影響，更進一步推測該物種是增強細胞膜偶極電位，或是相反(如表 1 所述)。

$$R(\%) = \frac{\text{Ratio}_{\text{Control}} - \text{Ratio}_{\text{Chemical}}}{\text{Ratio}_{\text{Control}}} \times 100\%$$

R(%)：代表新定義出的 R 值。

Ratio<sub>Control</sub>：代表對照組所測出的 R 值。

Ratio<sub>Chemical</sub>：代表各物種所測得的 R 值。

表 1 加入膽固醇後，各物種利用公式所算出的 R(%)

	(C)2hr_R_%	(C)12hr_R_%
A-beta(25-35)(T)_0.053 g/l	9.095435013	12.67875874
A-beta(25-35)(T)_0.053 g/l_A	18.1270354	24.49888866
PBS(T)_70	-1.71912725	3.05075805

### 計畫成果自評

整體而言，此研究計畫之目標在於鑑別與了解 amyloid 胜肽與細胞膜間之交互作用。此 amyloid 胜肽與細胞膜間之交互作用已知與胜肽聚集(peptide aggregation)和細胞毒殺性(neurotoxicity)具密不可分之關係。研究中利用電位高敏感性之

styrylpyridinium 染劑配合螢光光譜激發光譜量測技術檢視及鑑定 amyloid 胜肽之聚集狀態(aggregation state)和胜肽胺基酸順序(amino acid sequence)對胜肽與數種磷脂質類模型細胞膜(model membrane)間交互作用之影響，並進行系統化之探討。本年度完成(1)電位高敏感性之 styrylpyridinium 染劑配合螢光量測系統最適化操作條件之探討；(2)以電位高敏感性之 styrylpyridinium 染劑配合螢光量測 A $\beta$ (25-35) (fresh or aged)與磷脂質模型細胞膜間交互作用後之細胞膜偶極電位之變化；(3)探討細胞膜組成如膽固醇對 amyloid-磷脂質模型細胞膜偶極電位之影響等。擬將現有成果延伸至下年度，除進行 A $\beta$ (1-40)及其他 amyloid 蛋白質之探討，與膽固醇對 amyloid-磷脂質模型細胞膜偶極電位之影響進一步深入研究外，亦嘗試著手進行神經細胞培養實驗，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 $\beta$ -細胞膜間交互作用之機制與 A $\beta$  誘發之神經毒性作進一步之探討與了解。

#### 參考資料

- Ando, H.Y., Schultz, T.W., Schnaare, R.L., and Sugita, E.T. 1984. Percutaneous-Absorption - a New Physicochemical Predictive Model for Maximum Human In vivo Penetration Rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **73**: 461-467.
- Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Igbavboa, U., Warden, C.S., Schroeder, F., and Wood, W.G. 1999. Lipid binding to sterol carrier protein-2 is inhibited by ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1437**: 37-45.
- Brockman, H. 1994. Dipole Potential of Lipid-Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **73**: 57-79.
- Burgevin, M.C., Passat, M., Daniel, N., Capet, M., and Doble, A. 1994. Congo red protects against toxicity of beta-amyloid peptides on rat hippocampal neurones. *Neuroreport* **5**: 2429-2432.
- Choo-Smith, L.P., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G., and Surewicz, W.K. 1997. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta- (1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **272**: 22987-22990.
- Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J.M., and O'Shea, P. 1999. Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes - Role of the membrane dipole potential. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 29951-29959.

- Cladera, J., and O'Shea, P. 1998. Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide. *Biophys J* **74**: 2434-2442.
- Cladera, J., O'Shea, P., Hadgraft, J., and Valenta, C. 2003. Influence of molecular dipoles on human skin permeability: Use of 6-ketocholestanol to enhance the transdermal delivery of bacitracin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **92**: 1018-1027.
- Clarke, R.J. 2001. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in Colloid and Interface Science* **89**: 263-281.
- Del Mar Martinez-Senac, M., Villalain, J., and Gomez-Fernandez, J.C. 1999. Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* **265**: 744-753.
- Frears, E.R., Stephens, D.J., Walters, C.E., Davies, H., and Austen, B.M. 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* **10**: 1699-1705.
- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. 1999. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**: 8876-8884.
- Hertel, C., Terzi, E., Hauser, N., Jakob-Rotne, R., Seelig, J., and Kemp, J.A. 1997. Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9412-9416.
- Howland, D.S., Trusko, S.P., Savage, M.J., Reaume, A.G., Lang, D.M., Hirsch, J.D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B.D., Scott, R.W., et al. 1998. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J. Biol. Chem.* **273**: 16576-16582.
- Kelly, J.W. 1998. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 101-106.
- Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J. Biol. Chem.* **275**: 3173-3178.
- Kremer, J.J., Pallitto, M.M., Sklansky, D.J., and Murphy, R.M. 2000. Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* **39**: 10309-10318.

- 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**: 3342-3344.
- Lorenzo, A., and Yankner, B.A. 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12243-12247.
- Maggio, B. 1999. Modulation of phospholipase A(2) by electrostatic fields and dipole potential of glycosphingolipids in monolayers. *Journal of Lipid Research* **40**: 930-939.
- Matsuzaki, K., and Horikiri, C. 1999. Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes. *Biochemistry* **38**: 4137-4142.
- McLaurin, J., Franklin, T., Fraser, P.E., and Chakrabartty, A. 1998. Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer beta-amyloid peptides with gangliosides. *J. Biol. Chem.* **273**: 4506-4515.
- Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., and Kotova, E.A. 1997. Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics. *Biophys J* **73**: 850-854.
- Sadler, II, Smith, D.W., Shearman, M.S., Ragan, C.I., Taylor, V.J., and Pollack, S.J. 1995. Sulphated compounds attenuate beta-amyloid toxicity by inhibiting its association with cells. *Neuroreport* **7**: 49-53.
- Seilheimer, B., Bohrmann, B., Bondolfi, L., Muller, F., Stuber, D., and Dobeli, H. 1997. The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology. *J. Struct. Biol.* **119**: 59-71.
- Selkoe, D.J. 1994. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**: 438-447.
- Shapovalov, V.L., Kotova, E.A., Rokitskaya, T.I., and Antonenko, Y.N. 1999. Effect of gramicidin A on the dipole potential of phospholipid membranes. *Biophysical Journal* **77**: 299-305.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. A.* **95**: 6460-6464.
- Terzi, E., Holzemann, G., and Seelig, J. 1994. Alzheimer beta-amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry* **33**: 7434-7441.

- Terzi, E., Holzemann, G., and Seelig, J. 1995. Self-association of beta-amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes. *J Mol Biol* **252**: 633-642.
- Terzi, E., Holzemann, G., and Seelig, J. 1997. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* **36**: 14845-14852.
- Tomiyama, T., Asano, S., Suwa, Y., Morita, T., Kataoka, K., Mori, H., and Endo, N. 1994. Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid beta protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 76-83.
- Voglino, L., McIntosh, T.J., and Simon, S.A. 1998. Modulation of the binding of signal peptides to lipid bilayers by dipoles near the hydrocarbon-water interface. *Biochemistry* **37**: 12241-12252.
- Wang, S.S., Rymer, D.L., and Good, T.A. 2001. Reduction in cholesterol and sialic Acid content protects cells from the toxic effects of Beta -amyloid peptides. *J Biol Chem* **276**: 42027-42034.
- Ward, R.V., Jennings, K.H., Jepras, R., Neville, W., Owen, D.E., Hawkins, J., Christie, G., Davis, J.B., George, A., Karran, E.H., et al. 2000. Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of beta-amyloid peptide. *Biochem. J.* **348 Pt 1**: 137-144.

## 出席國際學術會議心得報告及發表之論文

### 1. 心得報告

計畫主持人王勝仕參加在日本舉行之 10-th Symposium of Young Asian Biochemical Engineering Community (2004)及 Asia Europe Biorecognition Symposium 會議。茲將參加會議之議程分列如下：

<b>Conference/Meeting</b>	<b>City, Country</b>	<b>Date</b>
YABEC (2004)	Osaka, Japan	2004, Sept. 23-25
Asia Europe Biorecognition Symposium	Shimonoseki, Japan	2004, Sept. 26-27
Society of Chemical Engineers, Japan (SCEJ) meeting	Shimonoseki, Japan	2004, Sept. 27-28

於 10-th Symposium of Young Asian Biochemical Engineering Community (2004) 中發表一 oral presentation：“Examining the Mechanisms of Alzheimer’s Disease” 及一 poster：“Aggregation Kinetics of  $\beta$ -Amyloid Peptides in Different Solvent Environments”。於 Third Asia Europe Biorecognition Symposium 中發表一 oral presentation：“Examining the Mechanisms of Alzheimer’s Disease”。相關之邀請函、大會議程、與摘要見附件。

在此二國際研討會議中，除獲取相關新知與研究進展外，並與各國研究人員交換心得，收穫頗豐盛。

## 2. 發表論文及大會議程

# Examining the Mechanisms of Alzheimer's Disease

Steven Sheng-Shih Wang

Department of Chemical Engineering

National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106

## ABSTRACT

More than sixteen different human proteins can fold abnormally resulting in the formation of an amyloid fibril and some accompanying pathology. The proteins have little sequence homology; however, they are able to misfold or self-assemble into stable fibrils with a characteristic cross pleated  $\beta$ -sheet secondary structure. Among these proteins,  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) of Alzheimer's disease is the best characterized.  $A\beta$  is the primary protein component of senile plaques associated with Alzheimer's disease and has been implicated in the neurotoxicity associated with the disease.

The hypothesis that the aggregated  $A\beta$  leads to the neurotoxicity associated with AD has been widely accepted. Then one is left with several compelling questions: What are the intermolecular interactions that lead to  $A\beta$  aggregates and how might one control them? On a more macroscopic level, one could pose a similar question: What would be the structure of the aggregated toxic species and how might one alter the aggregation pathway to avoid the formation of toxic species? Finally, by what mechanism does aggregated  $A\beta$  interact with cells to cause neurotoxicity? In order to answer these questions, we set up experiments to (a) investigate the peptide structure, at the residue level, associated with self-assembly process of  $A\beta$ , (b) develop new tools to examine the toxicity of  $A\beta$  oligomeric species and characterize the size of toxic oligomers, (c) identify roles of membrane composition (cholesterol and gangliosides) and G protein activation in the mechanisms of the toxic action of  $A\beta$  on neurons, and (d) use different amyloid protein(s) to test the feasibility of this structure-function relationship. Achievement of these goals could be used to aid in the further understanding of mechanism of  $A\beta$  aggregation, the role of aggregate size in the toxicity, and the mechanism of  $A\beta$  toxicity.

The ability to investigate how  $A\beta$  aggregates, to characterize the correlation between size of aggregated  $A\beta$  species and toxicity, to demonstrate the role of cell membrane composition in  $A\beta$ 's toxic effect, and to understand how  $A\beta$  interact with cell membranes may lead to better understanding of  $A\beta$ -induced neurotoxicity and aid in developing potential treatments for Alzheimer's disease.



# Aggregation Kinetics of $\beta$ -Amyloid Peptides in Different Solvent Environments

Steven S.-S. Wang<sup>1</sup> and Josephine W.-J. Wu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering  
National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106

<sup>2</sup>Department of Optometry  
Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan 402

At least sixteen different human proteins can fold abnormally resulting in the formation of an amyloid fibril and some accompanying pathology. These proteins have little sequence homology; however, they are able to misfold or self-assemble into stable fibrils with a characteristic cross pleated  $\beta$ -sheet secondary structure.  $\beta$ -amyloid of Alzheimer's disease is the best characterized.  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) is the key protein component of senile plaques associated with Alzheimer's disease and has been implicated in the neurotoxicity associated with the disease.

Accumulating evidence indicates that the most crucial factor influencing  $A\beta$ -induced neurotoxicity is the aggregation state of  $A\beta$  species. Our previous results also showed the correlation between the type of initial solvent and the aggregation state of  $A\beta$  species. In the present work, we examined the kinetic behavior of  $\beta$ -amyloid peptide during the course of aggregation. Synthetic  $A\beta(1-40)$  and its partial fragments  $A\beta(25-35)$  were utilized in this study. We believe that this work contributes to our better understanding, from the kinetic perspective, of how  $A\beta$  species and its derivatives aggregate.

## Invitation to YABEC 2004

08. 05. 2004

Dr. Sheng-Shih Wang

Dear Dr. Sheng-Shih Wang

Young Asian Biochemical Engineers' Community 2004 (YABEC'04) will be held on Sept. 23 – 25, 2004 at the Cosmosquare International Education and Training Center in Osaka. On behalf of the organizing committee of YABEC'04, it is my pleasure to send this invitation for you to attend the forthcoming conference. We are looking forward to discussing your oral presentation entitled "Examining the Mechanisms of Alzheimer's Disease".

This will be the 10th YABEC meeting since the first meeting held in Seoul in 1995. It could be a good opportunity to look back our steps for these 10 years, and think our future collaboration. We would like to hold the conference under a catchphrase "Advancing together for another 10 years!"

We will have oral presentations, poster presentations, and scientific trip. Detailed information can be obtained from our home-page, which will be up-dated frequently, at URL <http://web-mff.kobe-c.ac.jp/YABEC04/YB2004.html>.

We are looking forward to meeting you at the conference.

With best wishes,

Masaaki Terashima, Dr. Eng.  
Professor  
Department of Human Environment Sciences  
School of Human Sciences  
Kobe College  
E-mail: [terasima@mail.kobe-c.ac.jp](mailto:terasima@mail.kobe-c.ac.jp)





## Welcome to YABEC 2004

---

YABEC 2004 in Osaka

Date: September, 23-25 (2004)

Place: Cosmosquare International Education And Training Center

Homepage: [Home page in English](#)

---

## Information on YABEC 2004

New info!

➔ [Schedule of Meeting](#) (Up-loaded on Aug. 25)

List of all presentations (Keynote Speech, Plenary lectures, Oral presentations, and Poster presentations) are available.

➔ [How to prepare poster](#) (Up-loaded on Aug. 25)

➔ [Technical Tour](#) (Up-loaded on Aug. 12)

---

➔ [Info of a Travel Agency -Pre and Post conference accomodations-](#)

➔ [Important information to YABECian from China area](#)

➔ [Message from Chair.](#)

OP-II- 3 (15:40 - 16:00)

**Jianjiang Zhong** (East China University of Science and Technology, Shanghai)

[New Elicitors as a Driving Force to Achieve a Highly Productive Bioprocess for Useful Plant Secondary Metabolites](#)

---

OP-II- 4 (16:00 - 16:20)

**Tsong-Rong Yan** (Tatung University, Taipei)

[Cloning and regulator prediction of \*Aspergillus niger\*  \$\beta\$ -glucosidase II](#)

---

OP-II- 5 (16:20 - 16:40)

**Congfa Li** (South China University of Tropical Agriculture, Hainan )

[Chiral 3-phenyllactic acid preparation by biocatalytic asymmetrical reduction of phenylpyruvic acid](#)

---

OP-II- 6 (16:40 - 17:00)

**Jer-Yiing Houng** (I-Shou University, Kaohsiung County)

[Enhance the Efficiency of the Asymmetric Bioreduction of Achiral Ketone with Statistical Methods](#)

---

## Oral Presentation III

OP-III- 1 (15:00 - 15:20)

**Zhangfa Tong** (Guangxi University, Nanning)

[Extraction and Purification of Hirudin from a Blood-Sucking Leech, \*Hirudinaria Manillensis\*](#)

---

OP-III- 2 (15:20 - 15:40)

**Gyun Min Lee** (Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejeon)

[Enhanced Human Thrombopoietin Production by Sodium Butyrate Addition to Serum-Free Suspension Culture of Bcl-2 Overexpressing CHO Cells](#)

---

OP-III- 3 (15:40 - 16:00)

**Yu-Chen Hu** (National Tsing Hua University, Hsinchu )

[Baculovirus as a Highly Efficient Gene Delivery Vector for the formation of Hepatitis Delta Virus-like particles in Mammalian Cells](#)

---

OP-III- 4 (16:00 - 16:20)

**Steven Sheng-Shih Wang** (National Taiwan University, Taipei)

[Examining the Mechanisms of Alzheimer's Disease](#)

---

OP-III- 5 (16:20 - 16:40)

**Hiroshi Ueda** (The University of Tokyo, Tokyo)

[Creation of sensor proteins for specific DNA sequences](#)

---

OP-III- 6 (16:40 - 17:00)

**Hea-Yeon Lee** (Osaka University, Osaka)

[Recognition of nano-well array based on electric gene chip](#)

---

[Go back to Conference schedule](#)

# Examining the Mechanisms of Alzheimer's Disease

Steven Sheng-Shih Wang

Department of Chemical Engineering

National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106

## ABSTRACT

More than sixteen different human proteins can fold abnormally resulting in the formation of an amyloid fibril and some accompanying pathology. The proteins have little sequence homology; however, they are able to misfold or self-assemble into stable fibrils with a characteristic cross pleated  $\beta$ -sheet secondary structure. Among these proteins,  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) of Alzheimer's disease is the best characterized.  $A\beta$  is the primary protein component of senile plaques associated with Alzheimer's disease and has been implicated in the neurotoxicity associated with the disease.

The hypothesis that the aggregated  $A\beta$  leads to the neurotoxicity associated with AD has been widely accepted. Then one is left with several compelling questions: What are the intermolecular interactions that lead to  $A\beta$  aggregates and how might one control them? On a more macroscopic level, one could pose a similar question: What would be the structure of the aggregated toxic species and how might one alter the aggregation pathway to avoid the formation of toxic species? Finally, by what mechanism does aggregated  $A\beta$  interact with cells to cause neurotoxicity? In order to answer these questions, we set up experiments to (a) investigate the peptide structure, at the residue level, associated with self-assembly process of  $A\beta$ , (b) develop new tools to examine the toxicity of  $A\beta$  oligomeric species and characterize the size of toxic oligomers, (c) identify roles of membrane composition (cholesterol and gangliosides) and G protein activation in the mechanisms of the toxic action of  $A\beta$  on neurons, and (d) use different amyloid protein(s) to test the feasibility of this structure-function relationship. Achievement of these goals could be used to aid in the further understanding of mechanism of  $A\beta$  aggregation, the role of aggregate size in the toxicity, and the mechanism of  $A\beta$  toxicity.

The ability to investigate how  $A\beta$  aggregates, to characterize the correlation between size of aggregated  $A\beta$  species and toxicity, to demonstrate the role of cell membrane composition in  $A\beta$ 's toxic effect, and to understand how  $A\beta$  interact with cell membranes may lead to better understanding of  $A\beta$ -induced neurotoxicity and aid in developing potential treatments for Alzheimer's disease.

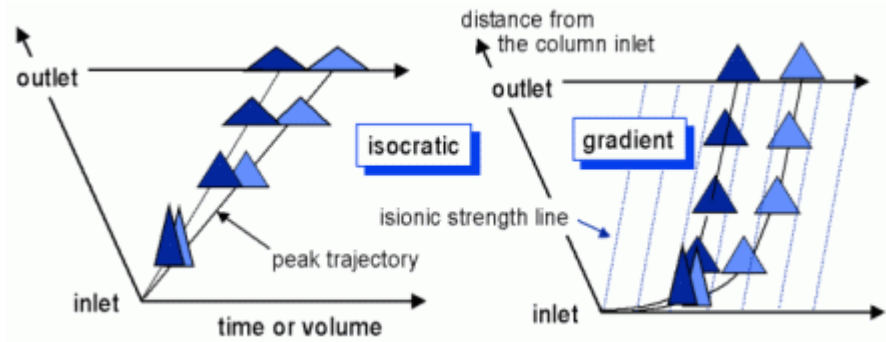
## International seminar 国際会議

### 5th Ube bioseparation seminar

September 25, Saturday, 2004, in Ube

Engineering School,  
Yamaguchi University  
第5回バイオ分離宇部  
セミナー

9月25日(土)山口大学工  
学部D11(宇部市)



### 3rd Asia-Europe Biorecognition Engineering Symposium in Shimonoseki

Sept. 26, Sun and 27, Mon, 2004 at Kaikyo Messe  
第3回アジアヨーロッパ生体認識工学シンポジウム(下関)  
下関海峡メッセ8F801 会議室(下関市)26日(日)27日(月)

### 5th Ube bioseparation seminar, Sept.25, Sat,13:00-19:00, at Yamaguchi Univ.,Ube "Separation process for antibodies and other protein drugs"

Shuichi Yamamoto, Yamaguchi University, Japan

Introductory remarks: Bioprocess chromatography for antibody and other protein drug purification.

Alois Jungbauer, IAM, Austria

Characteristics of Protein A chromatography media

Milos Barut, BIA separations, Slovenia

Monolithic support for chromatography of large biomolecules

Oliver Kaltenbrunner Amgen, USA

Application of modeling in the process characterization of ion-exchange chromatography of proteins

Peter Watler, Vaxgen, USA

Continuous chromatography operation for cost and capacity optimization of proteins

Testuro Ogawa, Pentax, Japan

Hydroxyapatite for antibody purification

Masayoshi Tsukahara and Takashi Ishihara, Kirin, Japan

Antibody production and purification processes for pharmaceuticals

Kazuhisa Uchida, Kyowa Hakko, Japan

A next generation antibody technology: De-fucosylation on improved effector function of antibodies and the impact for purification.

Yasutami Mitoma, Tosoh, Japan

Development of new chromatography media (Toyopearl) for antibody purification

-\*-\*- Get-acquainted party -\*-\*-



### 3rd Asia-Europe Biorecognition Engineering Symposium (AEBES)

Sept.26 at Kaikyo Messe Shimonoseki in  
Shimonoseki 13:30-18:00

**E.K.Lee, Hanyang University, Korea**

Solid-phase, site-specific, mono-PEGylation of rhIFN-alpha

**W.Y.Chen, National Central University, Taiwan**

Examples of thermodynamics and kinetics studies of biorecognition process by isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance

**R.C.Ruaan, National Central University, Taiwan**

Application of dual functional adsorbents to protein purification and refolding

**H.S.Liu, National Taiwan University, Taiwan**

Refolding of proteins in size-exclusion chromatography

**Shigeo Katoh, Kobe University, Japan**

Efficient refolding of proteins by using affinity ligand

**A.P.J.Middelberg, University of Queensland, Australia**

Refolding and purification processes for alfa-fetoprotein

**Makoto Yoshimoto, Yamaguchi University, Japan**

Liposome assisted refolding of proteins

**G.B.Lim, Suwon University, Korea**

Micro/Nanoparticle formation using supercritical fluids technologies

**S-S.Wang, National Taiwan University, Taiwan**

Understanding the mechanism of beta-amyloid associated neurotoxicity in Alzheimer's disease

**L.A.Sayavedra-Soto, Oregon State University, USA**

Physiology and molecular biology of butane degrading bacteria

### **Get-acquainted party 2**

**Sept.27 Poster session at Kaikyo Messe Shimonoseki**

**Joint session at Chemical Engineering Society meeting**

**Koji Nakamura, Tosoh, Japan**

Plasmid purification by chromatography

**Takashi Ishihara, Kirin, Japan**

Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography

**Y.Kumada, S.Katoh, Kobe Univ., Japan**

Efficient screening from libraries by using liposomes

**A.Kita, S.Yamamoto, Yamaguchi Univ., Japan**

Effect of conformational changes of biomolecules on chromatographic separations

**T,Aktas, Trakya Univ., Turkey**

Effect of pretreatments on the stability of dried cellular agricultural products

**S.Sonezaki, TOTO, Japan**

Titanium Dioxide Nanocomposites as "Artificial Enzyme"

**Additional papers will be dispalyed on this web site.**

**.-\*.-\*.- Get-acquainted party 3-.-\*.-\*.-**

**If you have any questions, let me know by [E.Mail](mailto:shuichi.yamamoto@chem.yamaguchi-u.ac.jp) . Shuichi Yamamoto**

**変更!! 参加費5000-13000円 (要旨集とGet-acquainted partyを含みます)。**

**25日のみ参加は5000円です。**

**25-27日参加は13000円ですが、これには上記要旨集,get-acquainted partyに加えて化学工学会山口下関大会の要旨集も含みます。**



なお化学工学会正会員の方で、[化学工学会山口下関大会](#)参加に別途  
申込をして既に登録費を支払いされた方については、5000円とします。  
ホテル予約もこちらで手配いたしますので、宿泊希望日時を記入して  
メールで申し込みください。 [guest2sy@yamaguchi-u.ac.jp](mailto:guest2sy@yamaguchi-u.ac.jp)