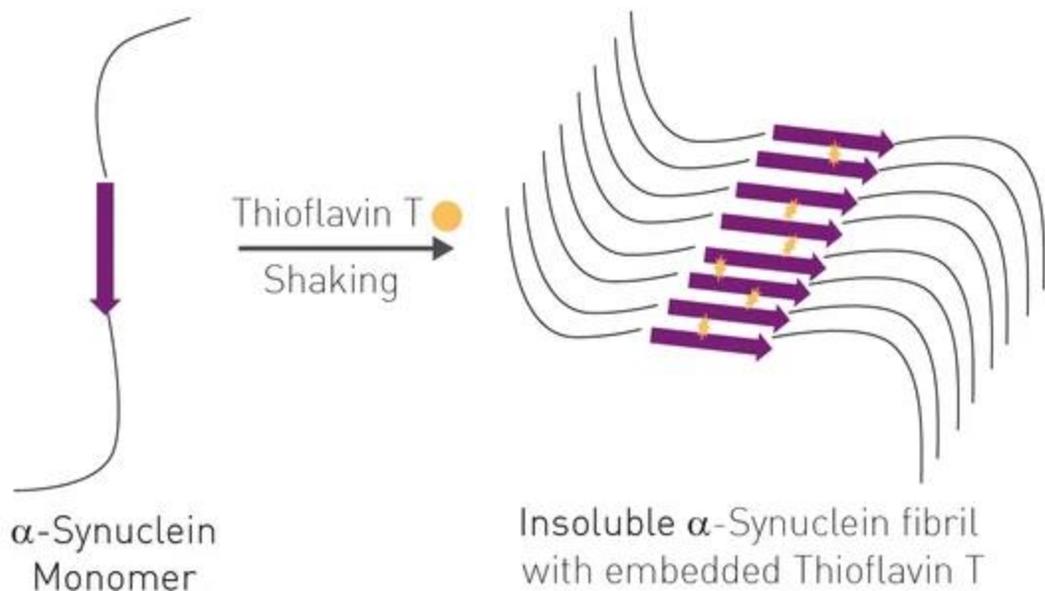


# BMG Reader長達167小時震盪，能有效分析抑制劑對於預防帕金森氏症 $\alpha$ S引起的疾病

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)主要病理特徵會在腦中出現具有細胞毒性路易體(Lewy bodies)其是否存在 $\alpha$ -突觸核蛋白( $\alpha$ -Synuclein,  $\alpha$ S)於澱粉樣蛋白纖維(amyloid fibrils)中。由低溫電子顯微鏡(cryo-EM)分析得知 $\alpha$ S為14 kDa蛋白質由三個不同區域構成，分別由residues 61-95中心由非類澱粉蛋白成分(central nonamyloidogenic component, NAC)構成、residues 1~60構成N端區域(N-terminal region, NTR)及residues 96-140構成C端區域(C-terminal region, CTR)。 $\alpha$ S的NAC區域大多數為疏水性，容易發生以 $\alpha$ S作為聚集種子模板(aggregation seed template)的纖維化。此外，近期的研究指出於NTR區域特定序列motif存在，對於澱粉樣蛋白纖維化形成扮演著重要角色。於本篇實驗中設計4種異構體胜肽(isomeric peptides)作為預防 $\alpha$ S聚集可能性抑制劑。這些胜肽是基於 $\alpha$ S的NAC及NTR片段發現的序列分別為, NAC-TP-L, NAC-TP-D, NTR-TP-L及NTR-TP-D。其胺基酸序列分別為 GVLYVGS-Aib(NTR-TP-L), gvlyvgs-Aib (NTR-TP-D), VAQKTV-Aib (NACTP-L)及 vaqktv-Aib (NAC-TP-D)。他們設計的目的是為了識別並融入不斷增生 $\alpha$ S的 $\beta$ -sheet結構，以C端的 $\alpha$ -aminobutyric acid (Aib)residues作為中斷 $\beta$ -strand生成的斷路器(breaker)。

## 檢驗原理

$\alpha$ S延長分析( $\alpha$ S elongation assay)及初成核分析(primary nucleation assay)為兩項成熟的螢光分析技術。兩種方法都是透過偵測硫磺素T(Thioflavin T, ThT)螢光增加來進行，純化過的野生型 $\alpha$ S(WT  $\alpha$ S)會在搖晃一段時間慢速聚集，ThT可從緩衝溶液中摻雜入不斷增生的 $\alpha$ S的 $\beta$ -strand結構中導致螢光增加，因此 $\beta$ -strand與螢光之間存在具有直接相關性。在 $\alpha$ S延長分析中反應開始時微量的種子纖維(seed fibrils)加入WT  $\alpha$ S中。相較於初成核分析144小時， $\alpha$ S延長分析減少了24小時。



圖一、 $\alpha$ S會緩慢聚集形成寡聚物(Oligomer)最終形成澱粉樣蛋白纖維(amyloid fibrils)，同時加入硫磺素T(ThT)。

## 材料方法

- 384孔微量孔盤(black polystyrene, Greiner)
- 硫磺素T(Sigma-Aldrich)
- 單體(Monomeric) $\alpha$ S (wild-type, WT)
- NAC and NTR, L & D胜肽抑制劑
- 全自動濾鏡式盤式分析儀Omega series plate reader (BMG LABTECH)

## 實驗流程

單體WT  $\alpha$ S依照先前文獻的方法表現並純化，胜肽抑制劑經由Fmoc固相態化學合成法進行製成。用於延長分析的種子纖維透過加熱及攪拌單體 $\alpha$ S(50  $\mu$ M in PBS, pH 7.4)於45 °C下進行24小時，隨後以超音波震盪處理。透過延長分析中及初成核分析評估NAC及NTR胜肽對於 $\alpha$ S纖維的形成。在37°C條件下使用ThT(20  $\mu$ M) 偵測 $\alpha$ S纖維延長24小時的變化。胜肽抑制劑分別以1:1或1:5的莫爾數比例加至帶有5%(w/w) $\alpha$ S種子纖維的單體 $\alpha$ S ( PBS 中 50  $\mu$ M , pH 7.4 ) 。初級成核分析中 $\alpha$ S纖維形成也使用ThT(20  $\mu$ M) ，在37°C下偵測144小時。胜肽抑制劑依分別以5:1、1:1、1:5莫爾濃度比例添加於單體 $\alpha$ S ( PBS中100 $\mu$ M , pH 7.4 ) 。所有分析至少進行三重複測試，這些數據皆以平均值 $\pm$ 標準差(mean $\pm$ SEM)獨立分析。

## 儀器設定

Fluorescence, plate mode kinetic		
光學設定	濾鏡(Filter)	Ex 440-10
		Em 490-10
常規設定	閃光次數(Number of flashes)	50
	設定時間(Settling time)	0.5 sec
動力學設定(Kinetic settings)		
延長分析 (Elongation assay)	循環次數(Number of cycles)	91
	週期時間(Cycle time)	1800 s
成核分析 (Nucleation assay)	循環次數(Number of cycles)	250
	週期時間(Cycle time)	1750 s
Incubation	37 °C	
Shaking	每個週期開始前20秒	
	Elongation assay: 120 rpm double orbital	
	Nucleation assay: 300 rpm double orbital	

## 結果與討論

於延長分析中結果顯示，WT  $\alpha$ S在4小時後即達到平台期，表示在這個時間點即形成成熟的纖維(mature fibril)。在莫爾比例為1:1的情況下，NAC-TP-L及NAC-TP-D的異構體(圖二，紫色及綠色曲線)，並沒有降低 $\alpha$ S的生成以及減少纖維延長率(rate of fibril elongation)。然而在NTR-TPs當中均顯著減少纖維的生成，NTR-TP-L抑制47%; NTR-TP-D抑制31%。以延長率(rate of elongation)NTR-TP-L降低8倍，NTR-TP-D降低9倍(圖二，玫瑰色及黃色曲線)。有趣的是在 $\alpha$ S: 胜肽抑制劑中1:5莫爾比，NTR-TP-D $\alpha$ S纖維生成率大幅度減少51%(圖二，綠色曲線)，NTR-TP-L在此比例下，對於纖維生成及延長率並無影響。值得注意的是兩者(NTR-TP-L及NTR-TP-D)均能有效預防纖維化延長率減少15倍及形成率抑制98%。

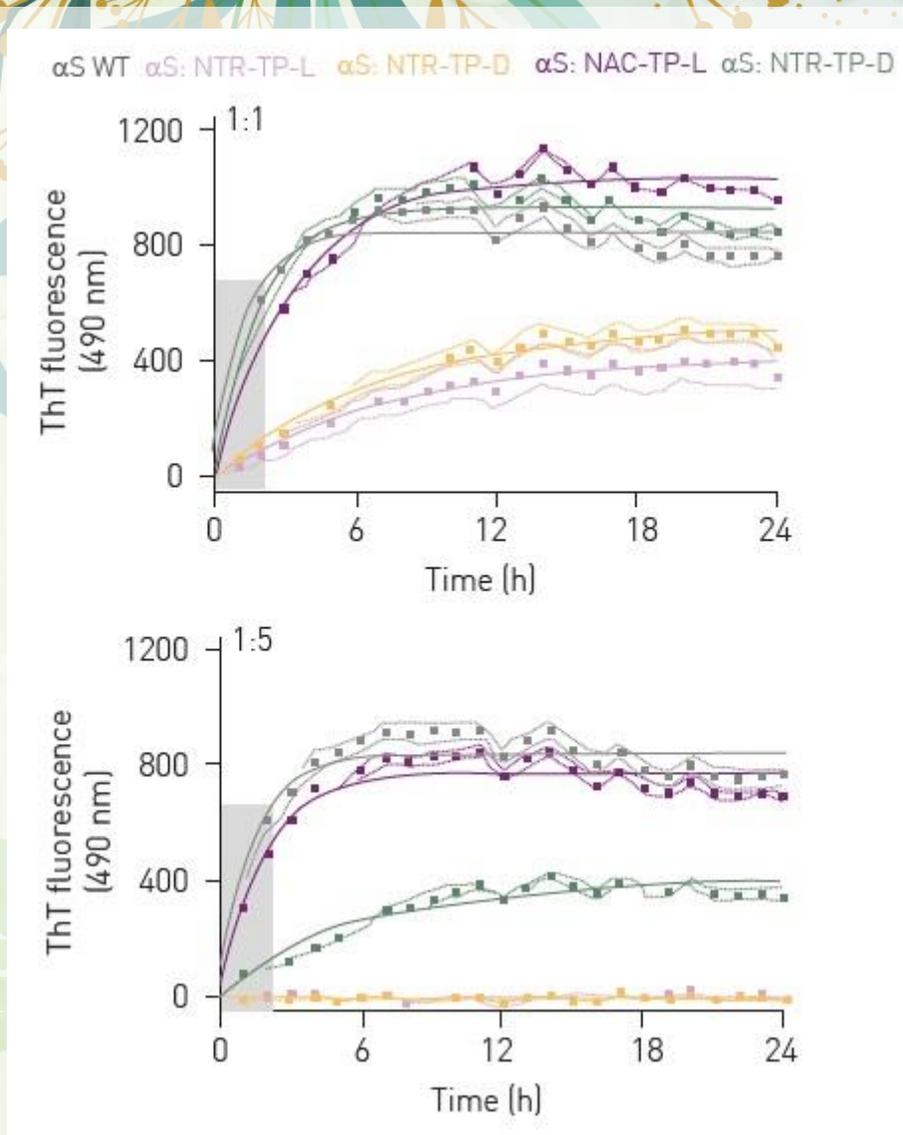
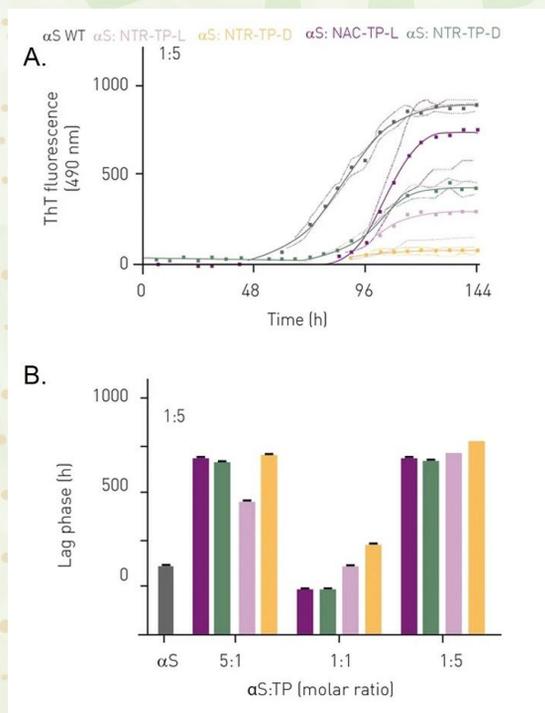


圖 2:  $\alpha$ S 延長分析(elongation kinetic assays)。分別為不使用抑制劑(灰色)及使用抑制劑組別。NTR-TP-L ( 玫瑰色 )、NTR-TP-D ( 黃色 )、NAC-TP-L ( 紫色 ) 和NAC-TP-D ( 綠色 )。纖維延長的速率是透過動力學曲線接近t=0的初始速度 ( 斜率 ) 來判定。

初成核分析分別1:1、1:5及5:1的比例 $\alpha$ S：抑制劑混合物進行實驗。不添加抑制劑的情況下， $\alpha$ S表現類似於S型函數聚集動力學曲線(aggregation kinetics)，其中延滯期(lag-phase)持續28小時，在52小時之後顯著的纖維延長被觀察到，並於115小時達到平原期(plateau)(圖三A、灰色曲線)。在所有莫爾濃度比例下NAC-TPs及NTR-TPs皆表現類似於S型函數聚集動力學曲線(圖三僅顯示1:5莫爾濃度)。綜合上述我們觀察到隨著NAC-TPs和NTR-TPs濃度增加總纖維產量(total fibril yield)會有所減少(數據未顯示)。此外，除了1:1莫爾數比的NAC-TPs(包含NAC-TP-L及NAC-TP-D)之外，在所有莫爾濃度比的NAC-TPs及NTR-TPs延滯期皆延長了。而在1:1莫爾濃度比的NAC-TPs相對單獨 $\alpha$ S組別延滯期減少了一些時間(圖三、B)。



圖三、(A)於1: 5比例下 $\alpha$ S:抑制劑初成核分析動力學曲線。WT  $\alpha$ S(灰色), NAC-TP-L(紫色), NAC-TP-D(綠色), NTR-TP-L(玫瑰色), NTR-TP-D(黃色)。(B)延滯時間於不同莫爾濃度 $\alpha$ S:抑制劑比例1:5、1:1及5:1。

## 結論

總而言之，我們篩選出來NAC-TPs及NTR-TPs都能降低成核速率並防止纖維延長，從而減少 $\alpha$ S纖維產量。細胞活力分析 (Cell viability) 研究指出，NAC-TPs和NTR-TPs顯著降低了 $\alpha$ S聚集對於Neuro-2a和Caco-2細胞的細胞毒性。總體而言，本研究為帕金森氏症 (PD) 治療藥物候選者設計和開發奠定了基礎。這項實驗長達167小時的震盪分析實驗，也顯示BMG盤式分析儀具有極佳的適應性，用於硫磺素T聚集分析。Optima為BMG舊款機型(本研究中使用的機器已有15年以上的歷史，仍然夠強壯可運行此實驗)，目前已由Omega全自動濾鏡式盤式分析儀取代。Omega配備了重型振盪機構、加熱裝置和軟體，輕鬆的演算法設定使ThT聚集分析變得更加簡單。

原廠文章: [Jovcevski et al. Peptidic inhibitors of  \$\alpha\$ -Synuclein preventing Parkinson' s disease-associated fibrilization and cytotoxicity \(2024\).](#)