

國立臺灣大學生命科學院生化科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



探究磷酸化濤蛋白纖維的形成

Exploring the fibril formation of

phosphorylated Tau Protein

詹庭軒

Ting-Hsuan Chan

指導教授：陳佩燁 博士

Advisor: Rita Pei-Yeh Chen, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July, 2019



謝誌

時間過得很快，還記得當初碩士班入學考試放榜得知自己考取台大生化所那刻的喜悅，到現在兩年過去了，從完全不會做實驗到現在有能力思考該做什麼及該怎麼做，感謝陳佩燁老師讓我有機會加入 504 實驗室這個大家庭，讓我有機會認識大家、認識科學研究、認識自己。

在這一段做實驗的時光中也遇到了很多困難，所幸陳佩燁老師及實驗室的夥伴們（信良學長、冠宇學長、雅涵學姊、韻婷學姊、煜晨學長、明親、至璿、俊廷、奕辰、頌邦）都時常給於我協助，不論是在實驗上的指導與建議或是實驗之外的煩惱，都讓我受益良多，給予我很多信心讓我能堅持在做實驗這條路上持續前行，也很感謝郭敏豪老師提供給我們實驗材料、純化方法及實驗上的建議，幫助我在純化蛋白質中遇到困難時找出問題在哪裡，引導我一步一步解決，讓我在碩士生涯第一年中無限實驗失敗的日子還抱有一絲絲的希望，所幸最後如願完成純化的實驗，讓實驗室在濤蛋白的研究之路正式啟航。

最後，謝謝所有在這兩年中幫助過我的人，讓我得以完成實驗及這篇碩士論文，沒有你們就不會有現在的我，謝謝。

詹庭軒 2019 年 7 月 中研院生化所



中文摘要

濤蛋白為一種微管結合蛋白，主要功能為維持微管的結構穩定並協助神經訊號傳遞正常運作，一旦一些磷酸激酶像肝醣合成激酶過度磷酸化濤蛋白，使其形成高度磷酸化的濤蛋白，這些過度磷酸化的濤蛋白則會降低和微管結合的能力而游離在細胞中，進一步聚集堆疊形成成對螺旋配對纖維，再進一步堆疊形成神經纖維糾結，這些糾結對神經細胞產生毒性病導致阿茲海默症。

到目前為止，因為製備磷酸化蛋白並不容易，因此許多研究針對濤蛋白而不是過度磷酸化的濤蛋白，所以建立一個可以表現磷酸化的濤蛋白很重要。有研究指出在肝素誘導形成的濤蛋白纖維結構中的 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 為形成纖維的核心區域，最近則有另一研究使用冷凍電子顯微鏡去觀察由阿茲海默病患腦中取出的神經纖維糾結，則發現只有在 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 被包含在形成纖維的核心區域。

在我們的研究主題中，我們想要了解究竟濤蛋白和過度磷酸化的濤蛋白在形成纖維是否會使用不一樣的區域進行堆疊；除此之外，我們也想了解是否一些轉譯後修飾會影響纖維形成；最後，依據我們對濤蛋白纖維的了解，我們嘗試設計勝肽抑制物期望可以抑制纖維的形成，希望可以做為治療阿茲海默症的藥物。

關鍵字：濤蛋白、阿茲海默症、神經纖維糾結、勝肽抑制物、轉譯後修飾



Abstract

Tau protein is a microtubule-associated protein which can stabilize the microtubule and help the signal transduction work normally. When kinases like GSK over phosphorylates tau, the hyperphosphorylated tau (p-tau) cannot bind to microtubules but forms paired helical filaments and turn into neurofibrillary tangles. These neurofibrillary tangles lead to neuron death and eventually cause Alzheimer's disease (AD).

So far, most of the structural studies focus on tau but not p-tau because of the difficulty in preparing phosphorylated protein. Establishing the p-tau expression system is important for tau research. It has been reported that $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ and $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ are the core regions of the in vitro heparin-induced tau fibrils. Very recently, cryo-EM data showed that only $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ is in the amyloid core region of the p-tau paired helical filaments obtained from AD patients.

In this study, we aimed to investigate whether the fibrils formed of tau and p-tau might use different regions as the amyloid core. In addition, we wanted to know whether the post-translational modification near the fibril core region can affect the fibril formation. Furthermore, based on our knowledge about the p-tau fibrils, we aim to design the peptide inhibitors to suppress the p-tau fibril formation as a therapeutic strategy to treat AD.

Keywords: tau protein, Alzheimer's disease, neurofibrillary tangles, peptide inhibitor, post-translational modification



縮寫表 Abbreviations

ABC	Ammonium bicarbonate
ACN	Acetonitrile
ACT	Activation reagent
AD	Alzheimer's Disease
AGD	Argyrophilic grain disease
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
Cdk5	Cyclin-dependent kinases 5
Cryo-EM	Cryo-electron microscopy
DCM	Dichloromethane
DEP	Deprotection reagent
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDT	1,2-Ethanedithiol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FAD	Familial Alzheimer's Disease
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FTD	Frontotemporal dementia



GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
HCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HPLC	Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography
IDPs	Intrinsically disordered proteins
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
MARK	Microtubule affinity regulating kinase
MTBE	Methyl tert-butyl ether
NMM	N-methylmorpholine
OD	Optical density
PD	Parkinson's disease
PHF	Pair helical filament
PIMAX	Protein Interaction Module–assisted Function X
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
p-tau	Hyperphosphorylated tau
R1-R4	Microtubule-binding region 1-4
SAD	Sporadic Alzheimer's Disease
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ssNMR	Solid-state nuclear magnetic resonance
TBST	Tris buffered saline with tween-20
TEM	Transmission electron microscope
TEMED	Tetramethylethylenediamine



TFA	Trifluoroacetic acid
ThS	Thioflavin S
ThT	Thioflavin T
TIS	Triisopropylsilane
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UA	Uranyl acetate
A (Ala)	Alanine
C (Cys)	Cysteine
D (Asp)	Aspartic acid
E (Glu)	Glutamic acid
F (Phe)	Phenylalanine
G (Gly)	Glycine
H (His)	Histidine
I (Ile)	Isoleucine
K (Lys)	Lysine
L (Leu)	Leucine
M (Met)	Methionine
N (Asn)	Asparagine
P (Pro)	Proline
Q (Gln)	Glutamine
R (Arg)	Arginine
S (Ser)	Serine
T (Thr)	Threonine
V (Val)	Valine
W (Trp)	Tryptophan

Y (Tyr)

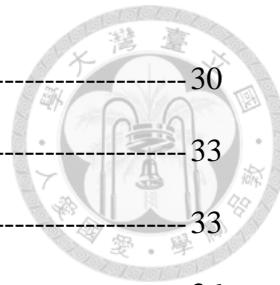
Tyrosine



目錄 Table of Contents



中文摘要 -----	i
Abstract -----	ii
縮寫表 Abbreviations-----	iii
第一章 緒論 -----	1
1.1 阿茲海默症 (Alzheimer's Disease, AD)-----	1
1.2 潤蛋白假說 (Tau hypothesis) -----	3
1.3 tau 的磷酸化與去磷酸化 -----	4
1.4 由細菌表現磷酸化的 tau -----	5
1.5 tau 的組成與神經纖維糾結形成的機制 (Fibrillization) 和結構 -----	6
1.6 tau 具有的轉譯後修飾 (Post-translational modification, PTM) -----	14
1.7 抑制 tau 形成澱粉樣纖維的方法 -----	16
1.8 神經纖維糾結結構對於阿茲海默症之關聯性 -----	19
1.9 實驗研究目的與實驗設計 -----	20
第二章 材料與方法 -----	26
2.1 材料 -----	26
2.1.1 水 -----	26
2.1.2 化學藥品 -----	26
2.1.3 細菌品種 (bacteria strain) -----	29
2.1.4 培養基 (medium)-----	29
2.1.5 tau/p-tau 質體 (plasmid) -----	30
2.1.6 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) -----	30



2.1.7 實驗儀器 -----	30
2.2 方法 -----	33
2.2.1 表現與純化 tau / p-tau -----	33
2.2.2 胜肽合成 -----	36
2.2.3 胜肽純化與鑑定 -----	37
2.2.4 西方墨點法 (western blot) -----	38
2.2.5 以動態光散射測量蛋白質粒徑大小 -----	38
2.2.6 p-tau 的液相層析-串聯式質譜分析 -----	38
2.2.7 以圓二色光譜儀測量胜肽二級結構 -----	39
2.2.8 tau / p-tau / 胜肽聚集測試 (aggregation test) -----	39
2.2.9 種晶的製備 -----	40
2.2.10 以場發射槍穿透式電子顯微鏡觀察 fibril 的圖像 -----	40
第三章 結果 -----	41
3.1 tau 的製備 -----	41
3.2 p-tau 的製備 -----	51
3.3 五種 tau 胜肽、一種有磷酸根的 tau 胜肽及兩種胜肽抑制物的製備 --	54
3.4 聚集測試 -----	68
3.4.1 p-tau-----	68
3.4.2 tau -----	76
3.4.3 tau 胜肽 -----	83
3.4.4 種晶效應-----	89
3.4.5 胜肽抑制物 -----	93
第四章 討論 -----	100
第五章 未來展望 -----	105



圖表目錄



圖 1.1 阿茲海默病患腦中的神經病理特徵	2
圖 1.2 tau 形成神經纖維糾結的機制	3
圖 1.3 tau 在神經細胞中的功能受磷酸化調控	5
圖 1.4 PIMAX Approach 示意圖	6
圖 1.5 tau 的結構示意圖	8
圖 1.6 tau 受過度磷酸化影響而使核心區域曝露	8
圖 1.7 heparin-induced tau 纖維形態	9
圖 1.8 heparin-induced tau 纖維 β 摺板結構位置	9
圖 1.9 p-tau 纖維 β 摺板結構位置	11
表 1.1 tau / p-tau 纖維的結構	12
圖 1.10 tau 磷酸化作用的位點	15
圖 1.11 tau 具有各種轉譯後修飾	15
表 1.2 針對結構設計的勝肽抑制物	18
圖 1.12 種晶效應示意圖	21
圖 1.13 實驗設計的五種勝肽	21
圖 1.14 ThS 實驗示意圖	22
表 1.3 種晶實驗結果預測表	22
圖 1.15 tau ₂₄₄₋₂₈₀ 、tau ₂₇₅₋₃₀₅ 和 tau ₂₈₁₋₃₁₁ 可能有轉譯後修飾的位置	23
圖 1.16 我們合成的帶有一個位點修飾的勝肽	23
圖 1.17 勝肽抑制物的設計	24
圖 1.18 勝肽抑制物實驗設計示意圖	25
表 1.4 勝肽抑制物實驗結果預測表	25
圖 3.1 純化 tau 的 SDS-PAGE 圖	42



圖 3.2 加熱完的 tau 樣品稀釋 100 倍進行全波長的吸光值測量圖	42
圖 3.3 tau 和不同量 TEV protease 反應後的 SDS-PAGE 圖.....	43
圖 3.4 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖....	44
圖 3.5 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖	44
圖 3.6 將 FPLC fraction 集中並濃縮後的 tau SDS-PAGE 圖.....	45
圖 3.7 用直接煮沸法同時破菌並純化 tau 的 SDS-PAGE 圖.....	45
圖 3.8 用冷凍破菌法和直接煮沸法同時破菌並純化 tau 的 SDS-PAGE 圖...	46
圖 3.9 鑑定 tau 樣品中是否含有核酸汙染的 agarose gel 圖	47
圖 3.10 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化結果圖	48
圖 3.11 將 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後收集的兩個吸收峰進行 SDS-PAGE 分析圖	49
圖 3.12 將 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後收集的兩個吸收峰進行 agarose gel electrophoresis 分析圖	49
圖 3.13 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後的 tau 進行全波長的吸光值測量圖	50
圖 3.14 去除 RNA 的 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖	50
圖 3.15 純化完成的 tau 的 SDS-PAGE 圖.....	51
圖 3.16 經冷凍破菌法和直接加熱法處理完的 p-tau 樣品稀釋 100 倍進行全波長的吸光值測量圖	52
圖 3.17 p-tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化結果圖	52
圖 3.18 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後的 p-tau 進行全波長的吸光值測量圖	53
圖 3.19 去除 RNA 的 p-tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖	53



圖 3.20 純化完成的 p-tau 的 SDS-PAGE 圖	54
圖 3.21 五種 tau 胜肽序列圖	54
圖 3.22 帶有磷酸根的 tau 胜肽	55
圖 3.23 兩種胜肽抑制物序列圖	55
圖 3.24 八種胜肽初產物的質譜圖	55
圖 3.25 八種胜肽的 HPLC 純化圖及純化後的質譜圖	60
圖 3.26 p-tau 的 BSA 定量	69
圖 3.27 利用微量盤螢光分光光譜儀測的只含有 buffer 和 ThS 而不含蛋白質樣品的控制組	69
圖 3.28 利用微量盤螢光分光光譜儀測的不含 RNA 的 p-tau aggregation test	70
圖 3.29 p-tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖	70
圖 3.30 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖	71
圖 3.31 純化 p-tau 的 SDS-PAGE 圖	71
圖 3.32 利用微量盤螢光分光光譜儀測的含 RNA 的 p-tau aggregation test ...	72
圖 3.33 p-tau fibril 的 TEM 照片	73
圖 3.34 p-tau 的液相層析-串聯式質譜分析	74
圖 3.35 使用 ThT 的 p-tau aggregation test	75
圖 3.36 使用螢光光譜儀測量 ThT 加 RNA 和普立昂纖維的螢光訊號	76
圖 3.37 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖..	77
圖 3.38 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖	77
圖 3.39 純化 tau 的 SDS-PAGE 圖	78
圖 3.40 利用微量盤螢光分光光譜儀測的只含有 buffer、heparin 和 ThS 而不含蛋白質樣品的控制組	79
圖 3.41 利用微量盤螢光分光光譜儀測的有含 RNA 的 tau aggregation test...	79
圖 3.42 利用微量盤螢光分光光譜儀測的不含 RNA 的 tau aggregation test...	81



圖 3.43 tau / p-tau 的西方墨點法	82
圖 3.44 以動態光散射測量 p-tau 粒徑大小	83
圖 3.45 利用螢光光譜儀測的只含 aggregation buffer 和 heparin 的控制組 ...	83
圖 3.46 使用螢光光譜儀測的 tau 胜肽 aggregation test.....	84
圖 3.47 tau 胜肽纖維的 TEM 照片	86
圖 3.48 使用螢光光譜儀測的帶有修飾的 tau 胜肽 aggregation test.....	88
圖 3.49 p-tau 種晶製備過程中的上清液及種晶進行全波長的吸光值測量圖 ..	90
圖 3.50 製備種晶時的上清液的 SDS-PAGE 圖	91
圖 3.51 使用螢光光譜儀測的 p-tau 種晶效應	91
圖 3.52 使用螢光光譜儀測的 tau 種晶效應	92
圖 3.53 使用螢光光譜儀測量胜肽抑制物是否會形成纖維	93
圖 3.54 使用圓二色光譜儀測量胜肽抑制物的二級結構	94
圖 3.55 使用螢光光譜儀測量胜肽抑制物對五種胜肽的抑制效果	95
圖 3.56 利用微量盤螢光分光光譜儀測量胜肽抑制物對含有 RNA 的 p-tau 及含有 heparin 但不含 RNA 的 tau 的抑制效果	97
圖 4.1 種晶實驗統整圖	102
表 4.1 種晶實驗結果統整表	104
表 4.2 胜肽抑制物實驗結果統整表	104



第一章 緒論

1.1 阿茲海默症 (Alzheimer's Disease, AD)

阿茲海默症為一慢性神經退化性疾病，在失智症 (dementia) 中佔有最高的比例 (Burns and Iliffe 2009)，患者早期會有短期記憶喪失的問題，隨著病情逐漸惡化，開始出現情緒不穩定、語言和定向障礙、生活無法自理等症狀，而慢慢喪失身體機能並導致死亡 (Masters, Bateman et al. 2015)。早至 1901 年時，阿茲海默症的病例最早由德國精神科醫生 Alois Alzheimer 提出，當時 Alois Alzheimer 觀察並記錄一位 50 歲女性病患 Auguste Deter 的病程，直到 1906 年病患死亡，病患表現出現今典型的阿茲海默症症狀，包括記憶衰退、認知障礙等等，並在病患腦組織中發現大量神經元喪失伴隨著許多類澱粉斑塊 (amyloid plaques) 及神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles)，而後 Alois Alzheimer 發表此病例，並在 1910 年時由 Emil Kraepelin 正式將此疾病以第一個發現者 Alois Alzheimer 的名字命名為「阿茲海默症」 (Berchtold and Cotman 1998)。

隨著醫療科技發展，人類的壽命也愈來愈長，阿茲海默症已成為消耗最多社會資源的疾病之一。依據全球疾病負擔研究報告 (Global Burden of Disease Study)，在 2015 年時全球約有 2980 萬人罹患阿茲海默症，同年有約 190 萬人死於失智症，阿茲海默症造成社會負擔的問題日益嚴重，顯然成為現代社會一大問題，因此阿茲海默症的研究愈來愈受到重視。阿茲海默症的成因至今依然不明，普遍認為是由類澱粉斑塊及神經纖維糾結導致的神經死亡引起，其中這些類澱粉斑塊和神經纖維糾結也是阿茲海默病主要病理特徵 (Mucke 2009) (圖 1.1)。類澱粉斑塊由類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 被酵素 β 分泌酶 (β -secretase) 及 γ 分泌酶 (γ -secretase) 切割產生的類澱粉蛋白 (amyloid- β , A β) 組成，類澱粉蛋白在腦中堆積並形成寡聚體 (oligomer) 或更進階形成類澱粉斑塊，破壞神經突觸並影響神經訊號傳遞，造成神經死亡，導致阿茲海默症；神經纖維糾結則由過



度磷酸化的濤蛋白 (hyperphosphorylated tau, p-tau) 組成，過度磷酸化的濤蛋白會失去和微管 (microtubule) 的結合並在神經細胞中形成成對螺旋纖維 (pair helical filament, PHF) ，再進一步形成神經纖維糾結，對神經細胞產生毒性，而神經細胞內的微管也逐漸瓦解使細胞骨架維持的運輸系統崩壞，導致神經細胞之間的訊號傳遞功能喪失，最終使神經細胞死亡，造成阿茲海默症 (Ballard, Gauthier et al. 2011)。

阿茲海默症主要分為兩種類型：家族性阿茲海默症 (Familial Alzheimer's Disease, FAD) 和偶發型阿茲海默症 (Sporadic Alzheimer's Disease, SAD)，家族性阿茲海默症病患常在 65 歲之前發病，故又稱為早發性阿茲海默症 (early-onset AD)，這類的疾病成因和基因突變有關，包含了類澱粉前驅蛋白、早老素 PSEN1 和 PSEN2 基因的突變，影響類澱粉前驅蛋白的切除，使類澱粉斑塊的主要成分 A β 42 在細胞中的數量變多，最終導致阿茲海默症 (Scheltens, Blennow et al. 2016)；偶發型阿茲海默症則由基因和環境因素所影響，為目前最主要的阿茲海默症類型，也稱為晚發型阿茲海默症 (late-onset AD)，包括年齡老化及帶有 E 型載脂蛋白 (apolipoprotein E, APOE) 中的 $\epsilon 4$ 對偶基因 (allele) (Strittmatter, Saunders et al. 1993)。

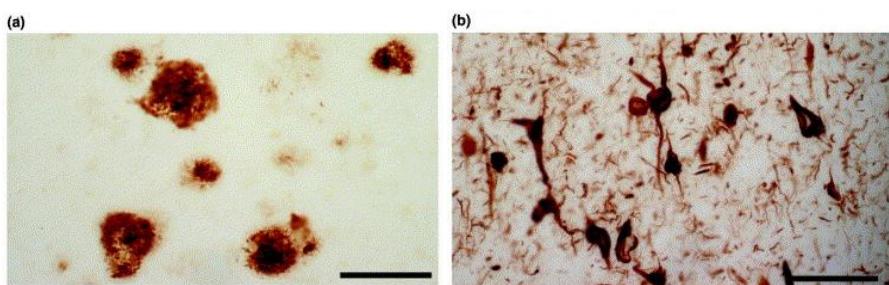


圖 1.1 阿茲海默病患腦中的神經病理特徵。

圖 (a) 為類澱粉斑塊，由抗 A β 42 抗體 (anti-A β 42 antibody) 做免疫染色的結果；圖 (b) 神經纖維糾結，由抗 PHF 抗體 (anti-PHF1 specific antibody) 做免疫染色的結果。比例尺為 62.5 μm (LaFerla and Oddo 2005)。



1.2 潤蛋白假說 (Tau hypothesis)

目前對於阿茲海默症的成因尚未了解，其中有一派科學家提出潤蛋白假說，該假說提出正常情況下帶有少許磷酸根的 tau 在神經細胞中和微管結合，維持微管結構的穩定性並協助神經訊號傳遞運作，受到磷酸激酶 (kinase) 和去磷酸酶 (phosphatase) 調控，一但 tau 被一些磷酸激酶像是肝糖合成激酶 (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 和週期素依賴性激酶-5 (cyclin-dependent kinases 5, Cdk5) 過度作用而產生高度磷酸化的 p-tau，這些 p-tau 會降低和微管的結合能力並傾向於聚集形成 PHF，PHF 再進一步聚集成神經纖維糾結 (Goedert, Spillantini et al. 1991)，造成微管失去穩定而瓦解並使神經訊號傳遞喪失機能，最終導致神經細胞死亡，引起阿茲海默症 (Chun and Johnson 2007) (圖 1.2)。

上述潤蛋白假說指出 p-tau 不正常的累積對於神經細胞有很大的損害，為造成神經退化的元兇，除了造成阿茲海默症外，tau 蛋白質異常沉積 (tauopathy) 也造成其他神經退化性疾病像是額顳葉型失智症 (Frontotemporal Dementia, FTD)、帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD) (Selkoe and Podlisny 2002)、嗜銀顆粒症 (argyrophilic grain disease, AGD) 等疾病 (Ferrer, Santpere et al. 2008)，愈來愈多神經退化性疾病被發現和 tau 有所關聯，讓 tau 逐漸被重視。

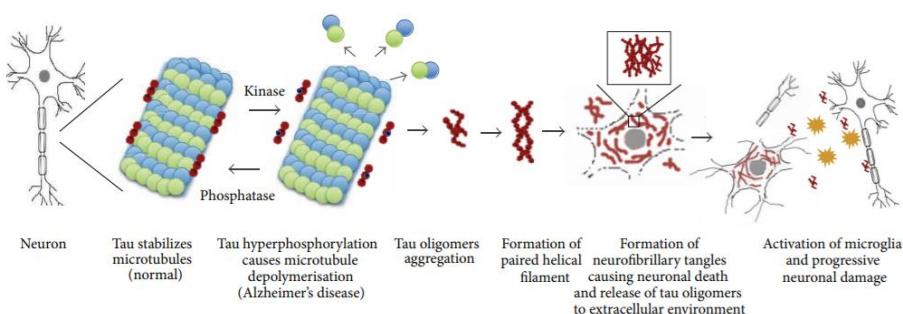


圖 1.2 tau 形成神經纖維糾結的機制。

tau 被過度磷酸化而失去和微管的結合，聚集形成 PHF 和神經纖維糾結，造成神經細胞死亡 (Mokhtar, Bakuraysah et al. 2013)。



1.3 tau 的磷酸化與去磷酸化

tau 在神經細胞中具有磷酸化現象，在 1983 年時，有研究萃取成年及未成年老鼠腦中的微管，並從中分離出 tau，在試管內 (*in vitro*) 混合 tau 和 kinase，發現 tau 能被多種 kinase 在不同的位點進行磷酸化，指出 tau 是一種能在多個位點被磷酸化的蛋白質 (Pierre and Nunez 1983)。隔年，另一個研究使用 tau 和微管做實驗，發現當 tau 被進一步磷酸化後，會降低和微管之間的結合能力，指出磷酸化會影響 tau 結合微管的論點 (Lindwall and Cole 1984)。到 1992 年，有研究從健康的人及阿茲海默病患腦中萃取出 tau 和 PHF 並進行分析，發現正常的 tau 只帶有 2-3 個磷酸根，但 PHF 中的 tau 却帶有 6-8 個磷酸根 (Ksiezik-Reding, Liu et al. 1992)。這些研究顯示出 tau 的磷酸化具有意義，可能會影響 tau 的功能及形成澱粉樣纖維 (amyloid fibril) 的能力。

隨著 tau 磷酸化的研究愈來愈多，已發現神經細胞內有許多 kinase 和 phosphatase 共同調控 tau 的磷酸化，像是 GSK3 β 、Cdk5、環磷酸腺苷依賴蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinase) 和微管親和調節激酶 (microtubule affinity regulating kinase, MARK) 等 kinase 能磷酸化 tau；磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 和磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 等 phosphatase 則可去磷酸化 tau，透過這些酵素的調控使 tau 能實施功能。例如：(一)調控 tau 和微管之間的交互作用：tau 的磷酸化程度可以改變 tau 和微管之間的結合能力，進而影響微管的組裝 (Breuzard, Hubert et al. 2013)，像是 Ser262 和 Thr231 被磷酸化即會導致 tau 和微管結合的能力下降 (Biernat, Gustke et al. 1993, Cho and Johnson 2003)。(二)調節神經突觸的延伸：MARK 和 PKA 可以調控神經突觸向外生長 (Biernat, Wu et al. 2002)；GSK3 可以調控神經突觸的收縮 (Sayas, Avila et al. 2002)。(三)控制軸突運輸能力：調控神經軸突內的物質傳遞，但當 tau 被過度磷酸化後則導致軸突病變 (axonopathy) 而使軸突運輸異常導致神經細胞死亡 (圖 1.3)。

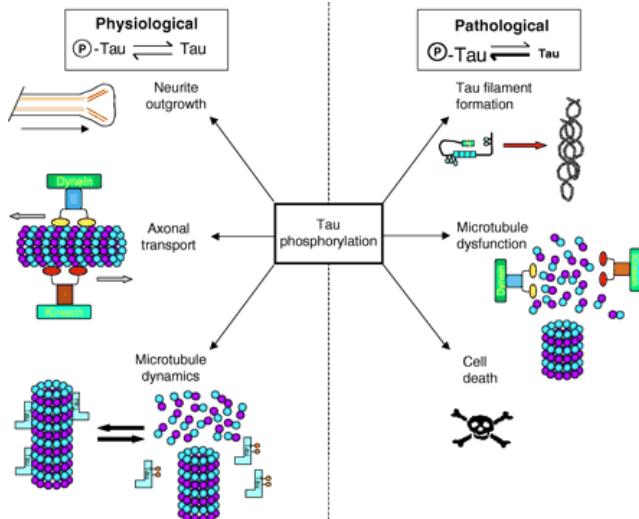


圖 1.3 tau 在神經細胞中的功能受磷酸化調控。

tau 被不同 kinase 和 phosphatase 調控而在神經細胞中協助物質運輸並幫助訊號傳遞，一但調控失衡則造成神經細胞死亡 (Johnson and Stoothoff 2004)。

1.4 由細菌表現磷酸化的 tau

上述提到在神經細胞內的 tau 帶有 2-3 個磷酸根，p-tau 則帶有 6-8 個磷酸根 (Ksieczak-Reding, Liu et al. 1992)，現今大多數研究採用細菌表現出 tau 以進行實驗，但這種 tau 不帶有任何磷酸根，自然情況下不會自發性形成澱粉樣纖維，需要肝素 (heparin) 的幫助才能形成澱粉樣纖維，但真實情況下，神經細胞內不具有 heparin，因此利用肝素誘發 (heparin-induced) 形成的 tau 纖維研究有時候備受懷疑 (Fichou, Vigers et al. 2018)。因此，建立一個可以表達 p-tau 的系統對於 tau 研究很重要，傳統上大多數實驗室要製備 p-tau 必須分別純化 tau 和 kinase，再將兩者均勻混合，在 *in vitro* 條件下進行磷酸化反應產生 p-tau，但這種方法較耗時，而後來美國密西根州立大學生化分生所的郭敏豪老師設計出可以在細菌內直接表現 p-tau 的方法，稱為 Protein Interaction Module–assisted Function X (PIMAX) Approach，設計一種質體可以同時表現 kinase 和 tau，分別為 His6 tag-Fos-Thrombin-GSK 和 Jun-TEV-Tau，Jun 和 Fos 透過蛋白質之間的作用力 (protein-protein interaction) 亮氨酸拉鍊 (leucine zipper) 而靠近，使 GKS 可以對

tau 進行磷酸化作用，產生 p-tau (圖 1.4)，該研究團隊隨後也對 p-tau 進行定性測試 (qualitative analysis)，發現 p-tau 磷酸化的位點和 tau 可以被 GSK 作用的位點相同，透過該方法取得的 p-tau 比一般不帶有任何磷酸根的 tau 更符合神經細胞內真實的情況，因此比較適合用來做 tau 纖維抑制劑的實驗 (Sui, Xu et al. 2015)。

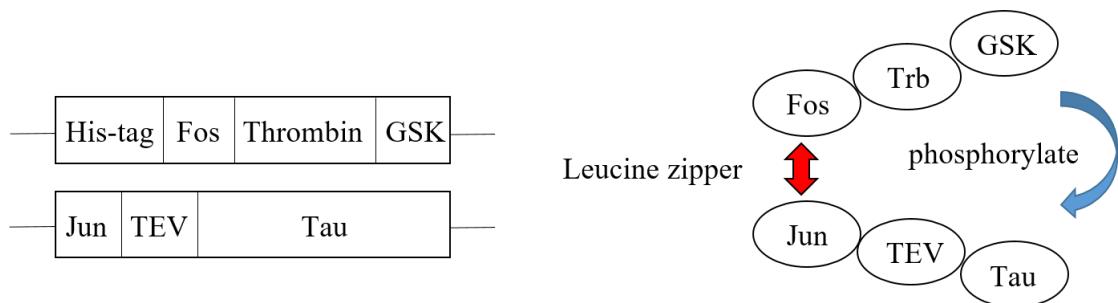


圖 1.4 PIMAX Approach 示意圖。

左圖為 PIMAX 系統中設計的質體，可以表現出 His6 tag-Fos-Thrombin-GSK 和 Jun-TEV-Tau 兩種蛋白；右圖為 Fos 和 Jun 之間透過 leucine zipper 作用力而使兩種蛋白靠近彼此，使 GSK 對 tau 進行磷酸化作用，產生 p-tau。

1.5 tau 的組成與神經纖維糾結形成的機制 (Fibrillization) 和結構

tau 為一種固有無序蛋白質 (intrinsically disordered proteins, IDPs)，在一般生理條件下並沒有固定結構 (Skrabana, Sevcik et al. 2006)，由 N 端區域 (N-terminal region)、脯氨酸豐富區域 (proline-rich region) 和 C 端區域 (C-terminal region) 組成，其中 C 端區域中包含四個微管結合區域 (microtubule-binding region 1-4, R1-R4)，人類具有的 tau 依照具有零、一或二個 N 端區域及三個微管結合區域 (無 R2) 或四個微管結合區域分為六種異構物 (isoform)，分別為 0N3R、1N3R、2N3R、0N4R、1N4R 和 2N4R，其中在成年人神經細胞中主要存在的 isoform 為 1N3R 和 1N4R (Goedert and Jakes 1990)。Tau 透過微管結合區域和微管結合並保

持微管結構穩定性 (Sergeant, Delacourte et al. 2005)，而微管結合區域二和三中的 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ (PHF6*) 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ (PHF6) 被視為形成神經纖維糾結的核心區域 (圖 1.5)，正常情況下 tau 帶有負電荷的 N 端區域和帶有正電荷的 C 端區域會互相作用而使夾在中間的 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 被包覆，一但 tau 被過度磷酸化，又磷酸化的位點大多數在 proline-rich region 和 C 端區域，影響了 N 端和 C 端之間的作用力，使 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 曝露出來而有機會靠近彼此而堆疊形成 oligomer，接著形成 PHF (圖 1.6)，再進一步形成神經纖維糾結，對神經細胞造成傷害 (Alonso, Zaidi et al. 2001)，隨著神經細胞死亡，這些神經纖維糾結會被釋出而傷害其他神經細胞，最終導致阿茲海默症。

後續也有許多研究利用不同的方法去看 tau fibril 的結構，像是有用固態核磁共振 (solid-state nuclear magnetic resonance, ssNMR) 去看 tau peptide 形成的 PHF 結構，該研究使用的是含 R1、R3 和 R4 的 K19 peptide，其中 PHF 在 V306-S324 有形成三個 β 股 (β -strand) 結構，其中第一個 β -strand 即由 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 組成，強調了 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 對於 tau 形成澱粉樣纖維的重要性 (Daebel, Chinnathambi et al. 2012)；有其他研究使用冷凍電子顯微鏡 (Cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 觀察 heparin 引發的 tau 纖維化，結果看到許多種類的纖維結構，包括蛇狀纖維 (snake filament)、旋風狀纖維 (twister filament) 和軟管狀纖維 (hose filament) 等等 (圖 1.7)，其中在 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 都有形成 β -strand 結構 (Zhang, Falcon et al. 2019) (圖 1.8)；也有另一個研究同樣使用冷凍電子顯微鏡去看病人腦中萃取出的 p-tau 纖維結構，則發現在 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 有形成 β -strand 結構 (Fitzpatrick, Falcon et al. 2017) (圖 1.9)。這些研究都指出 tau 中的四個微管結合區域對於 tau 形成澱粉樣纖維很重要，特別是 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 。

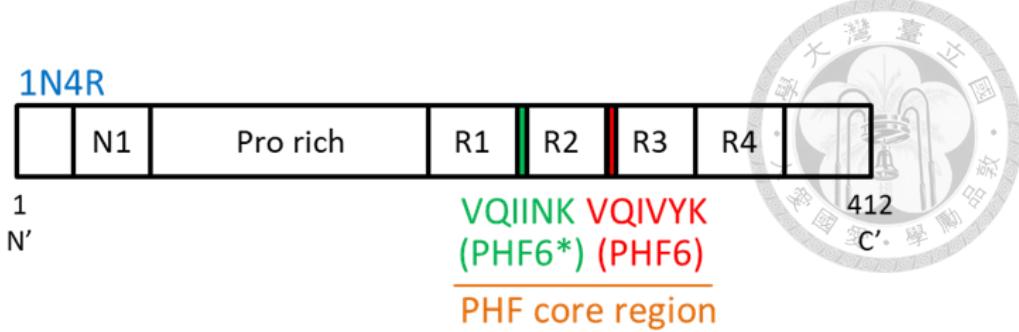


圖 1.5 tau 的結構示意圖。

圖為 tau (1N4R) 的結構組成示意圖，具有一個 N 端區域 (N1)、脯氨酸豐富區域 (Pro rich) 及 C 端區域，其中 C 端區域包括四個微管結合區域 (R1-R4)，R2 和 R3 包含 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ (PHF6*) 及 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ (PHF6)，被視為 tau 用來堆疊形成澱粉樣纖維的核心區域。

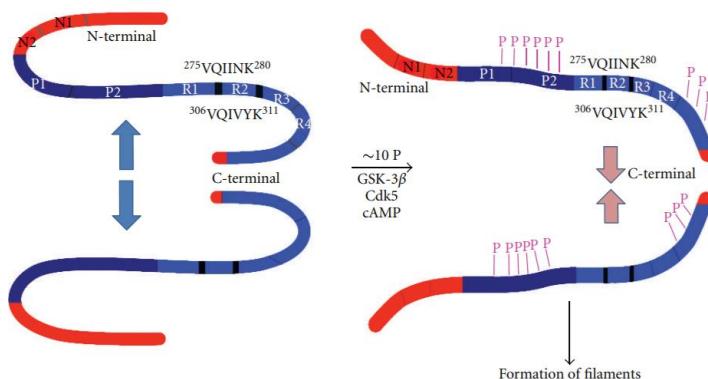


圖 1.6 tau 受過度磷酸化影響而使核心區域曝露。

當 tau 被過度磷酸化之後會使 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 曝露出來而讓彼此有機會堆疊聚集形成神經纖維糾結 (Kolarova, Garcia-Sierra et al. 2012)。

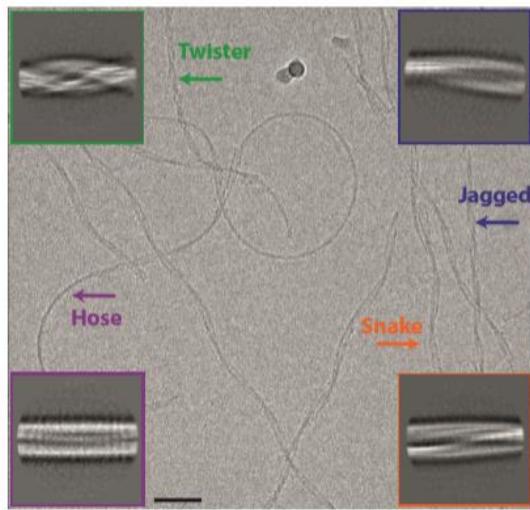
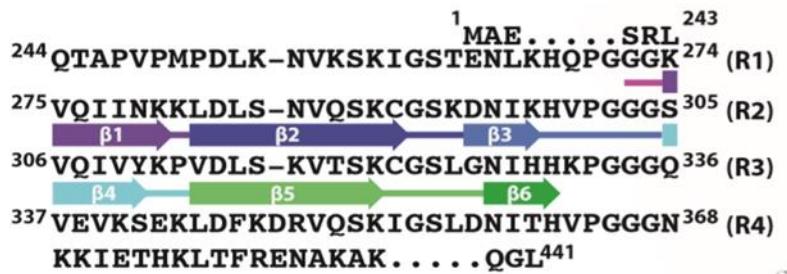


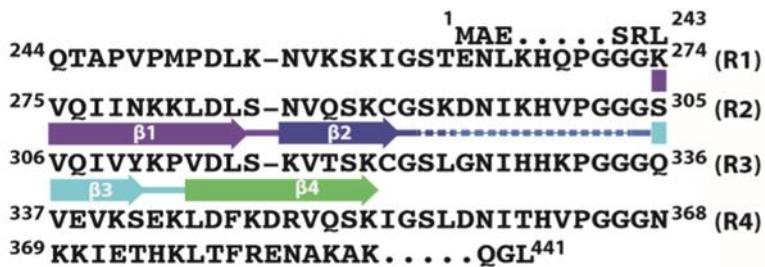
圖 1.7 heparin-induced tau 纖維形態。

冷凍電子顯微鏡下所觀察到的 heparin-induced tau 纖維，具有多種形態，包括蛇狀纖維 (snake filament)、旋風狀纖維 (twister filament)、鋸齒狀纖維 (jagged) 和軟管狀纖維 (hose filament) 等等。比例尺為 50nm (Zhang, Falcon et al. 2019)。

(A)

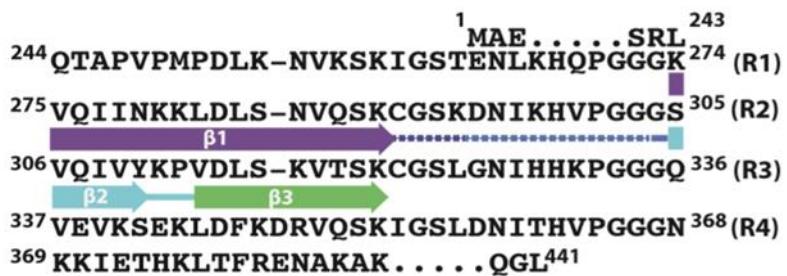


(B)





(C)



(D)

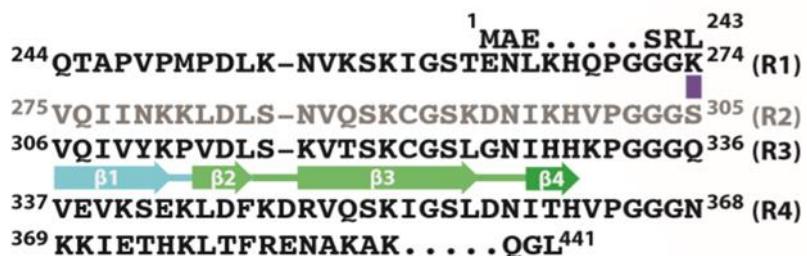


圖 1.8 heparin-induced tau 纖維 β 摺板結構位置。

冷凍電子顯微鏡下觀察到的各式 heparin-induced tau 纖維之 β 摺板結構位置。(A)

2N4R tau 蛇狀纖維。(B) 2N4R tau 旋風狀纖維。(C) 2N4R tau 鋸齒狀纖維。(D)

2N3R tau 纖維，灰色字體代表 2N3R tau 不具有的 R2 區域 (Zhang, Falcon et al. 2019)。

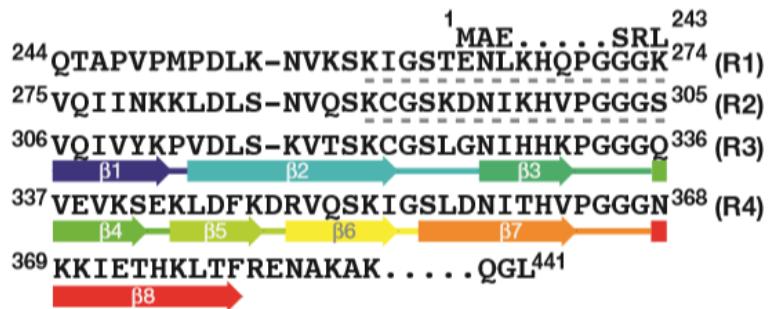


圖 1.9 p-tau 纖維 β 摺板結構位置。

冷凍電子顯微鏡下觀察到的 p-tau 纖維之 β 摺板結構位置 (Fitzpatrick, Falcon et al. 2017)。

澱粉樣纖維	方法	β 摺板結構位置	參考文獻
K19 (244-372/ Δ R2 ₂₇₅₋₃₀₅) 纖維	加 heparin，用固 態核磁共振觀察	V306-K324 (含 3 個 β 摺板： V306-V311、 V313-L315、 K317-C322)	Daebel, Chinnathambi et al. 2012
2N4R tau 纖維	加 heparin，用冷 凍電子顯微鏡觀 察	K274-H330 (含 6 個 β 摺板： K274-K280、 L282-C291、 D295-K298、 S305-Y310、 V313-K321、 N327-H330)	Zhang, Falcon et al. 2019
		K274-K321 (含 4 個 β 摺板： K274-L284、 N286-C291、 S305-Y310、 V313-K321)	
		K274-K321 (含 3 個 β 摺板： K274-K290、 S305-Y310、 V313-L321)	



2N3R tau 纖維		K274-H330 (含 4 個 β 摺板： K274-K310、 V313-L315、 K317-L325、 I328-H330)	
p-tau 纖維	沒加 heparin，用 冷凍電子顯微鏡 觀察	V306-F378 (含 8 個 β 摺板： V306-K311、 V313-C322、 N327-K331、 Q336-S341、 K343-K347、 R349-I354、 S356-V363、 N368-F378)	Fitzpatrick, Falcon et al. 2017

表 1.1 tau / p-tau 纖維的結構。

統整一些關於 tau / p-tau 纖維結構的研究。



1.6 tau 具有的轉譯後修飾 (Post-translational modification, PTM)

tau 帶有許多轉譯後修飾，不同位點的修飾對於 tau 的功能有不同的影響，例如：(一)磷酸化 (phosphorylation) (圖 1.10)：Thr231 的磷酸化會導致 tau 局部結構有所變化而使 GSK3 β 或其它 kinase 可以更近一步磷酸化 tau (Lin, Cheng et al. 2007)；Ser214/Ser262 的磷酸化會使 tau 和微管結合的親和力下降 (Schneider, Biernat et al. 1999)；Ser199/Ser202/Thr205 的磷酸化會使微管重組並降低 tau 結合微管的能力，也會破壞粒線體移動的能力而導致神經細胞死亡 (Shahpasand, Uemura et al. 2012)。(二)甲基化 (methylation)：K259/K290/K353 的甲基化可以調節 tau 和微管的結合，且甲基化修飾也對 tau 形成神經纖維糾結有所影響 (Funk, Thomas et al. 2014)。(三)乙醯化 (acetylation)：Lys280 的乙醯化會降低 tau 和微管的結合能力而使游離的 tau 數量增加，產生更多 PHF (Cohen, Guo et al. 2011)；Lys321 的乙醯化可以防止 Ser324 被磷酸化，並抑制 tau 形成 PHF 而降低神經纖維糾結的生成 (Carlomagno, Chung et al. 2017)；Lys259/Lys353 的乙醯化可以阻止 Ser262/Ser353 被磷酸化 (Cook, Carlomagno et al. 2014)。

除了上述提到的轉譯後修飾外，tau 還有被發現具有泛素化修飾 (ubiquitination)、糖基化修飾 (glycosylation)、硝基化修飾 (Nitration) 等等 (Liu, Zaidi et al. 2002, Horiguchi, Uryu et al. 2003, Lee, Lee et al. 2013) (圖 1.11)，這些修飾對於 tau 各有不同的作用機制，在不同胺基酸上的不同修飾對於 tau 有不同的影響，包括改變 tau 和微管之間的親和力及形成 PHF 的能力，不同的修飾之間也有交互作用 (crosstalk)，例如糖基和磷酸根之間的交互作用會影響 tau 局部結構的改變 (Bourré, Cantrelle et al. 2018)。透過這些轉譯後修飾調控 tau 的作用來維持神經細胞正常運作。

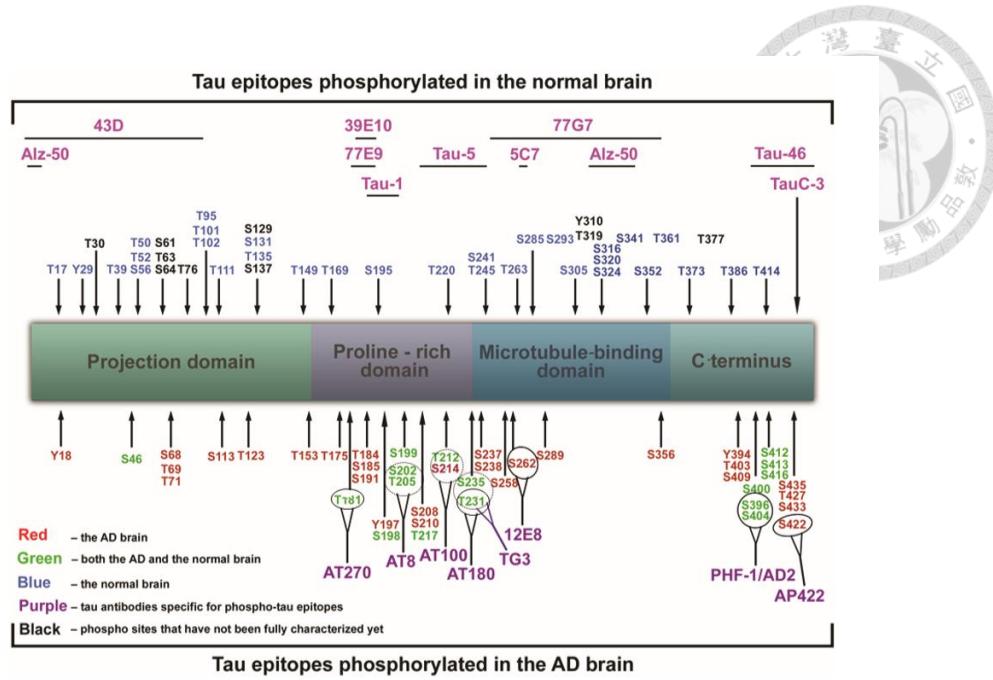


圖 1.10 tau 磷酸化作用的位點。

Tau 有許多胺基酸可以被磷酸化，此圖列出了健康的人和阿茲海默病患腦中曾被發現帶有磷酸根的位子 (Simic, Babic Leko et al. 2016)。

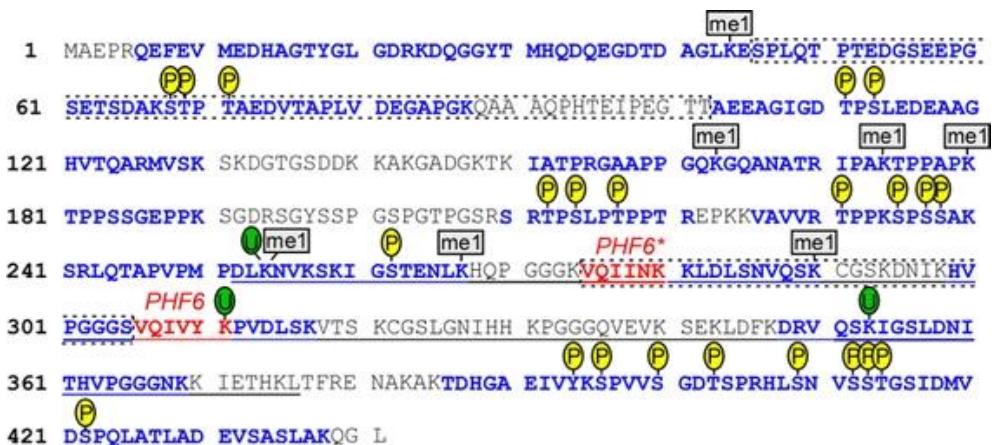


圖 1.11 tau 具有各種轉譯後修飾。

利用液相層析-串聯式質譜分析 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) tau 上的修飾，藍色部分為實驗中和資料庫分析比對後得到的 tau 序列，紅色部分為兩個形成神經纖維糾結的核心區域，可以發現 tau 上有許多修飾，包括磷酸化、甲基化、泛素化等等 (Thomas, Funk et al. 2012)。



1.7 抑制 tau 形成澱粉樣纖維的方法

神經纖維糾結對神經細胞的傷害為導致阿茲海默症的元兇之一，有許多研究試圖找出方法來阻止 tau 纖維的形成，希望可以減緩或阻止神經細胞的死亡。有研究將目標放在主要導致 tau 過度磷酸化的 GSK 身上，設計一些 GSK inhibitor 用以降低 GSK 的活性，並在老鼠實驗中發現可以減緩 tau 纖維的形成，推論或許 GSK inhibitor 有潛力當成預防阿茲海默症的藥物 (Perez, Hernandez et al. 2003, Noble, Planel et al. 2005)；也有其他研究則是著重在 PP2A phosphatase 身上，PP2A 是最主要對 tau 進行去磷酸化的酵素 (Goedert, Jakes et al. 1995)，而在阿茲海默病患腦中的 PP2A 活性較低 (Gong, Shaikh et al. 1995)，因此 PP2A 活性的降低被認為也是導致阿茲海默症的原因之一，所以有些研究設計一些藥物用以提高 PP2A 的活性，並發現可以減少 tau 的過度磷酸化 (Li, Sengupta et al. 2004)。此外，也有研究針對 Cdk5 / p25 下手，Cdk5 也是導致 tau 磷酸化的酵素之一，設計可以抑制 Cdk5 / p25 的抑制物 TFP5，經腹腔注射到老鼠體內，發現可以延緩 tau 的過度磷酸化及神經纖維糾結的形成，同時也減少了 A β 的累積及大腦發炎的症狀 (Shukla, Zheng et al. 2013)。而針對 kinase 或 phosphatase 來減少 tau 纖維形成的方法即使有效，但也有許多潛在的擔憂，因為 kinase 和 phosphatase 除了作用在 tau 身上之外，也調控許多訊號傳遞路徑，即便可以抑制 tau 的過度磷酸化，同時也可能導致其他訊號傳遞受到影響，因此這方面的實驗還需要更多數據來驗證。

也有一些研究針對 tau 形成澱粉樣纖維的重要區域 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 來設計抑制物，有些研究依照 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 來設計勝肽抑制物 (peptide inhibitor) 干擾 tau 堆疊形成澱粉樣纖維，像是合成出與 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 相似序列的勝肽，讓該勝肽去競爭原本 tau 之間 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 的結合位，以達到阻止 tau 纖維形成的目的，他們利用電腦模擬出可能有抑制效果的勝肽抑制物，針對 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 設計了序列為



TLKIVW 的抑制物，經實驗後發現該抑制物無法有效抑制 tau 形成澱粉樣纖維；針對 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 則是設計了序列為 DVQMINKKRK (MINK)、DVWMINNNKRK (W-MINK)、DVQWINNNKRK (WINK) 等抑制物，其中發現 W-MINK 可以有效抑制 tau 形成澱粉樣纖維，因此提出 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 對於 tau 纖維的形成有較大的影響 (Seidler, Boyer et al. 2018)。有研究則是選用 D- 式 (D-form) 的勝肽抑制物來進行測試 (Sievers, Karanicolas et al. 2011)，或是合成出環狀的勝肽抑制物用以抑制勝肽纖維的形成 (Zheng, Liu et al. 2011)；也有其他研究設計了同時含有 D- 式和 L- 式 (L-form) 的環狀勝肽抑制物，稱為 cyclic D,L- α -peptide lead CP-2，序列为 [IJwHsK]，方框號代表該勝肽為環狀，大寫英文字代表 L-form 肽基酸，小寫英文字則代表 D-form 肽基酸，J 代表正亮胺酸 (norleucine)，發現這種抑制物可以抑制勝肽 Ac- $^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ (Ac-PHF6-NH₂) 形成澱粉樣纖維 (Belostozky, Richman et al. 2018)。此外，也有研究合成一面帶有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 相似序列、另一面帶有其他序列的環狀勝肽，並合成可以形成澱粉樣纖維的短勝肽 Ac- $^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ 來模擬 tau，讓環狀勝肽利用 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 結合到 peptide 的 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 上，而因為環狀勝肽另一面不帶有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 序列，導致無法再和其他的短勝肽 Ac- $^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ 結合，因此可以阻擋其他勝肽繼續堆疊上來，藉此阻斷勝肽之間的堆疊，減緩該勝肽形成澱粉樣纖維的能力 (Wang, Northfield et al. 2016)。



胜肽抑制物名稱	抑制目標序列	結果	參考文獻
TLKIVW	$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	無法有效抑制 tau 形成澱粉樣纖維	Seidler, Boyer et al. 2018
MINK	$^{275}\text{VQIINK}^{280}$	三種抑制物皆可 抑制 tau 纖維形 成，但 W-MINK 的抑制效果最好	
W-MINK			
WINK			
cyclic D,L- α -peptide lead CP-2	$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	可以抑制胜肽 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 纖 維的形成	Belostozky, Richman et al. 2018
SFAI 系列的環狀 胜肽抑制物	$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	部分 SFAI 抑制 物可以抑制胜肽 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 纖 維的形成	Wang, Northfield, et al. 2016
環狀 VQIVY-KL	$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	在 $100 \mu\text{M}$ 高濃 度下可以抑制胜 肽 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 纖維的形成	Zheng, Liu et al. 2011
環狀 QIVYK-LK		沒有抑制效果	
D-TLKIVW	$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	可以減緩 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 纖 維的形成	Sievers, Karanicolas et al. 2011

表 1.2 針對結構設計的胜肽抑制物。

統整一些研究所設計的胜肽抑制物，包含設計理念所針對的目標以及結果。



1.8 神經纖維糾結的結構對於阿茲海默症之關聯性

因為神經纖維糾結導致神經細胞死亡為阿茲海默症的成因之一，所以針對神經纖維糾結下手是一個有機會可以預防或治療阿茲海默症的方法。了解神經纖維糾結的結構對於 tau 是如何堆疊形成纖維很重要，先前許多研究指出 tau 可能透過 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 形成神經纖維糾結 (Inouye, Sharma et al. 2006)，因此很多研究也針對該兩段區域設計出各種抑制物 (inhibitor) 來干擾 tau 的不正常堆疊，例如用小分子藥物或是胜肽藥物 (Bulic, Pickhardt et al. 2010, Wang, Northfield et al. 2016, Seidler, Boyer et al. 2018)，期盼可以阻止神經纖維糾結的生成，以減緩神經細胞受到的危害。

上述提到有研究利用冷凍電子顯微鏡觀察由 heparin-induced tau 堆疊形成的神經纖維糾結中， $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 都有 β -strand 的結構，又澱粉樣纖維的形成需要 β -strand 結構，代表 tau 利用 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段去堆疊形成澱粉樣纖維 (Zhang, Falcon et al. 2019)，而這結果和之前的研究相同；但另一個研究發表指出利用冷凍電子顯微鏡觀察到由阿茲海默病患腦中取出的神經纖維糾結中只有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 帶有 β -strand 結構，代表 tau 只有利用 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段去堆疊形成澱粉樣纖維 (Fitzpatrick, Falcon et al. 2017)，因此現今對於 tau 究竟是用哪個片段去堆疊還需要透過更多實驗去驗證，除了能幫助我們更加了解 tau 的結構之外，也協助研發針對結構去干擾 tau 堆疊的藥物。



1.9 實驗研究目的與實驗設計

了解神經纖維糾結對於阿茲海默症是重要的一環，因此我的研究主要針對纖維結構的形成進行探討，主要分成三個部分：(1) 形成澱粉樣纖維的兩個核心區域哪一個比較重要；(2) 轉譯後修飾的影響；(3) 胜肽抑制物的設計 (peptide inhibitor)。

(一) 了解 p-tau 中兩個形成神經纖維的核心區域究竟哪個對於 p-tau 堆疊形成澱粉樣纖維比較重要，其中我們認為冷凍電子顯微鏡觀察病患腦中澱粉樣纖維的研究是較可信的，因為 heparin 並不存在於細胞內中，所以 heparin 引發形成的 tau 纖維並不一定和真實病患腦中的 p-tau 纖維相同，故我們推估只有³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 才是重要的核心區域，因此我們的假說為「p-tau 會利用³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 堆疊形成神經纖維糾結，而不是²⁷⁵VQIINK²⁸⁰。」為了驗證這個假說，我們會使用種晶效應 (seeding effect) 去印證，種晶效應即是將 tau 或 p-tau 纖維打碎成許多小片段 (fragment)，將這些片段加入各種胜肽樣品一起培養，如果這些纖維片段中形成澱粉樣纖維核心的序列跟某一胜肽相同，則可作為勝肽結構轉變的模板，促使胜肽加入這些纖維片段中，延長這些纖維 (Walker, Diamond et al. 2013) (圖 1.12)。我們首先用固相合成儀合成含有²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ 和³⁰⁶VQIVYK³¹¹ 的胜肽，並在 N 端及 C 端分別用乙醯化及醯胺化 (amidation) 修飾以模擬該胜肽在完整 tau protein 中兩端皆具有其他胺基酸連結的形式，包括 Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂ (PHF6*) 、 Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂ (PHF6) 、 tau244-280 (R1+PHF6*) 、 tau275-305 (PHF6*+R2) 和 tau281-311 (R2+PHF6) (圖 1.13)，我們用 PIMAX 系統表達 p-tau 並純化，將 p-tau 和 Thioflavin S (ThS) 共同培養，因為 ThS 的特性和 Thioflavin T (ThT) 相似，會和澱粉樣纖維結合而發出螢光 (fluorescence) (Khurana, Coleman et al. 2005)，故藉由偵測螢光訊號來觀測澱粉樣纖維的生成 (圖 1.14)，成功取得 p-tau 纖維之後，用超音波震動器 (sonicator) 將 p-tau 纖維打碎成許多小片段，這些小片段當成種晶 (seed)，看是否能加速以上這



些胜肽形成澱粉樣纖維，基於之前的纖維結構研究，我們預期 p-tau 纖維片段只能協助含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 的胜肽形成澱粉樣纖維，即是 p-tau 只對含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 序列之胜肽有種晶效應。

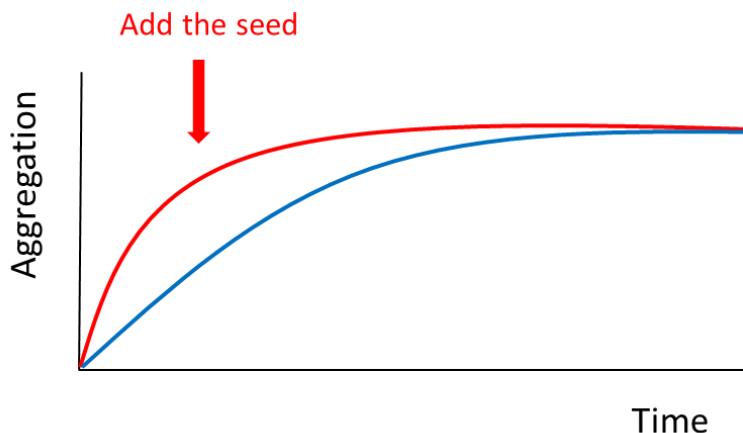


圖 1.12 種晶效應示意圖。

圖中藍線代表培養 protein 形成澱粉樣纖維時，隨著時間會有愈來愈多 protein 聚集長成澱粉樣纖維，並達到最大值；紅線代表加入 seed 一起培養，則會加快澱粉樣纖維生成的速度。

1. Ac-**VQIINK**-NH₂
2. Ac-**VQIVYK**-NH₂
3. tau244-280 (R1+PHF6*) Ac-QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGG**KVQIINK**-NH₂
4. tau275-305 (PHF6*+R2) Ac-**VQIINK**KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS-NH₂
5. tau281-311 (R2+PHF6) Ac-KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS**VQIVYK**-NH₂

圖 1.13 實驗設計的五種胜肽。

實驗設計所合成的胜肽序列。

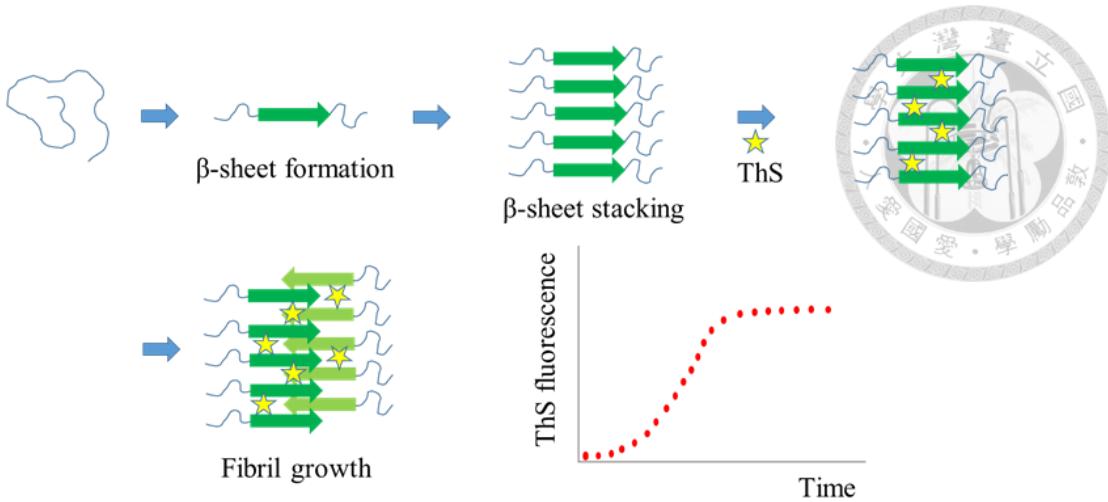


圖 1.14 ThS 實驗示意圖。

利用 ThS 會和澱粉樣纖維結合並發出螢光的特性來偵測澱粉樣纖維的生成。

	p-tau 種晶	tau 種晶
$^{275}\text{VQIINK}^{280}$	-	+
$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	+	+
tau244-280 (R1+PHF6*)	-	+
tau275-305 (PHF6*+R2)	-	+
tau281-311 (R2+PHF6)	+	+

表 1.3 種晶實驗結果預測表。

表格中的「+」代表種晶可以促使勝肽形成纖維；「-」代表種晶不能促使勝肽形成纖維。我們的假說認為 p-tau 會利用 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 堆疊形成神經纖維糾結，而不是 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ ，因此推測 p-tau 種晶只能促使含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段的勝肽形成纖維；tau 種晶則可以促使含有 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段的勝肽形成纖維。

(二)了解不同位點的轉譯後修飾是否對 tau 形成澱粉樣纖維有所影響，前人有許多 tau 的轉譯後修飾對結構特性的研究都是把可能發生轉譯後修飾的胺基酸以別的胺基酸取代，例如 K → Q, S (T) → A 或 E 等 (Rodríguez-Martín, Cuchillo-Ibáñez et al. 2013, Gorsky, Burnouf et al. 2016)。我們用固相合成的方式可以直接合成帶有轉譯後修飾的勝肽，上述提到我們合成了五種勝肽，其中三種較長序列的 tau244-280 (R1+PHF6*)、tau275-305 (PHF6*+R2) 和 tau281-311 (R2+PHF6) 之中，有些位點在神經細胞中可能會被修飾，像是 Ser262 和 Ser289 具有磷酸化，Lys254 和 Lys267 具有甲基化等等，我們想了解這些轉譯後修飾會不會加快或減緩 tau 堆疊形成澱粉樣纖維，因此我們會合成帶有修飾的這三種勝肽（圖 1.15），目前只合成了帶有一個磷酸根的 tau244-280，稱為 tau244-280 w/ pSer262（圖 1.16），並和沒有修飾的勝肽進行比較，看兩者之間在形成澱粉樣纖維上有沒有差異，藉此推測該修飾是否影響 tau 形成澱粉樣纖維。

*S: phosphorylation site
K: methylation site*

tau244-280 (R1+PHF6*) Ac-QTAPVPM_PD_LKNVKS_KI_GS_TE_NL_KHQPGGGK_{VQIINK}-NH₂
 tau275-305 (PHF6*+R2) Ac-_{VQIINK}KLDLSNVQ_S_KC_GS_KD_NI_KHVP_{GGGS}-NH₂
 tau281-311 (R2+PHF6) Ac-KLDLSNVQ_S_KC_GS_KD_NI_KHVP_{GGGS}_{VQIVYK}-NH₂

圖 1.15 tau244-280、tau275-305 和 tau281-311 可能有轉譯後修飾的位置。

這三種勝肽中的一些位點在人體中有可能帶有修飾，橘色為有可能被磷酸化的位點，紫色為有可能被甲基化的位點，我們會合成帶有一個位點修飾的勝肽來進行實驗（圖 1.13）。

tau 244-280 w/ pSer262 Ac-QTAPVPM_PD_LKNVKS_KI_GS_TE_NL_KHQPGGGK_{VQIINK}-NH₂

圖 1.16 我們合成的帶有一個位點修飾的勝肽。

我們先合成 tau244-280 且帶有一個磷酸根的勝肽。

(三)設計胜肽抑制物 (peptide inhibitor) 來干擾 p-tau 堆疊形成澱粉樣纖維，之前我們實驗室對 A β 胜肽抑制物的研究，我們發現在 A β 胜肽的核心區域 A β (25-35) 的 N 端接上八個 Arg，得到的 R8-A β (25-35) 可以抑制 A β 堆疊形成澱粉樣纖維 (Cheng, Chen et al. 2017)。仿照這個設計原理，再根據目前對 tau 纖維結構的研究，我們初步以 PHF6 和 PHF6 兩個形成澱粉樣纖維的核心區域為基礎來設計胜肽抑制物，我們將 275 VQIINK 280 及 306 VQIVYK 311 的 N 端接上八個 Arg，並再接上一個 Cys，供後續實驗可以進行螢光染劑的標記，這兩種胜肽抑制物稱為 R8-VQIINK 和 R8-VQIVYK (圖 1.17)，期望得到的 R8-VQIINK 或 R8-VQIVYK 胜肽抑制物會利用 VQIINK 或 VQIVYK 片段和 tau 或 p-tau 中的 275 VQIINK 280 或 306 VQIVYK 311 堆疊，並透過八個 Arg 帶有的高度正電荷來干預其他 tau 或 p-tau 分子繼續堆疊上去，以達到干擾 tau 或 p-tau 堆疊的能力，期望可以減緩 tau 或 p-tau 纖維對神經細胞造成的傷害 (圖 1.18)。

1. R8-VQIINK CRRRRRRRRVQIINK
2. R8-VQIVYK CRRRRRRRRVQIVYK

圖 1.17 胜肽抑制物的設計。

將 275 VQIINK 280 及 306 VQIVYK 311 的 N 端接上八個 Arg 作胜肽抑制物，希望有抑制 tau 堆疊的效果。

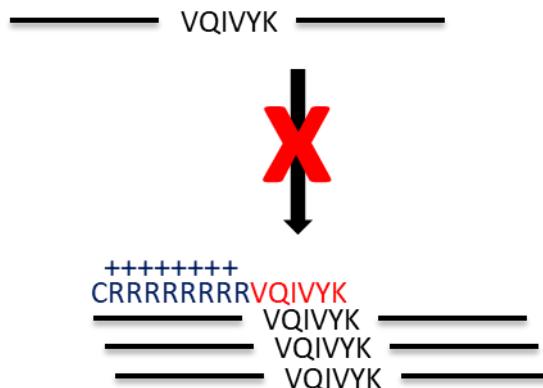


圖 1.18 胜肽抑制物實驗設計示意圖。

胜肽抑制物會和 tau 或 p-tau 用來堆疊形成纖維的核心區域結合，並藉由正電荷來干擾其他其他 tau 或 p-tau 分子繼續堆疊，藉此阻止、減緩 tau 或 p-tau 纖維的生成。

	R8-VQIINK	R8-VQIVYK
$^{275}\text{VQIINK}^{280}$	+	-
$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	-	+
tau244-280 (R1+PHF6*)	+	-
tau275-305 (PHF6*+R2)	+	-
tau281-311 (R2+PHF6)	-	+
tau	+	+
p-tau	-	+

表 1.4 胜肽抑制物實驗結果預測表。

表格中的「+」代表胜肽抑制物可以抑制胜肽或蛋白質形成纖維；「-」代表胜肽抑制物不能抑制胜肽或蛋白質形成纖維。我們的假說認為 R8-VQIINK 可以抑制含有 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 片段的胜肽和 tau，而 R8-VQIVYK 可以抑制含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段的胜肽、tau 及 p-tau。

第二章 材料與方法



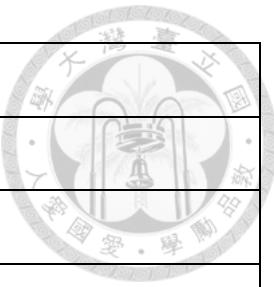
2.1 材料

2.1.1 水

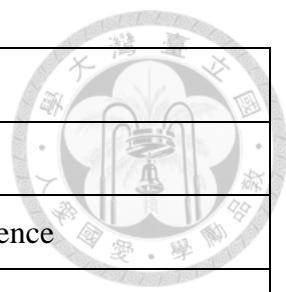
使用經 Milli-RO PLUS 60 和 Milli-QSP 淨水器處理的去離子蒸餾水。

2.1.2 化學藥品

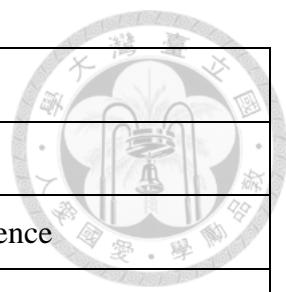
藥品	來源
1,2-Ethanedithiol (EDT)	Sigma
30% (v/v) Acrylamide / Bis-acrylamide (37.5:1)	Sigma
Acetic acid	Sigma
Acetic anhydride	Honeywell
Acetonitrile (ACN)	Fisher chemical
Agar	AMRESCO
Agarose	AMRESCO
Ammonium persulfate (APS)	Sigma
Ampicillin	Bioshop
Anti-Tau-1, clone PC1C6 antibody	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Bromophenol blue	AMRESCO
Coomassie brilliant blue	Sigma
Dichloromethane (DCM)	Honeywell
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	AMRESCO



Ethanol (EtOH)	J. T. Baker
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	MACRON
Fmoc-Ala-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Asn(Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Cys(Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Gln(Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Gly-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-His(Trt)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Ile-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Leu-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Lys preloaded Wang resin (K-Wang resin)	Merck
Fmoc-Lys(Boc)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Met-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Pro-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Ser preloaded Wang resin (S-Wang resin)	Merck
Fmoc-Ser(HPO3Bzl)-OH	AgeneMax
Fmoc-Ser(tBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Thr(tBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	AnaSpec Inc.
Fmoc-Val-OH	AnaSpec Inc.
Glycerol	VWR Life Science



Heparin sodium salt	Sigma
Isopropanol	J. T. Baker
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	VWR Life Science
lysozyme	AMRESCO
Magnesium sulfate	J. T. Baker
Methanol	MARCON
Methyl tert-butyl ether (MTBE)	MARCON
Mini protease inhibitor cocktail tablet	Roche
N,N-Dimethylformamide (DMF)	MARCON
N-methylmorpholine (NMM)	Alfa Aesar
O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HCTU)	Merck
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)	Sigma
Piperidine	UniRegion Bio-Tech
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immunoresearch
Powdered milk	Fonterra
Protein ladder	Thermo Scientific
Rink amide resin	Novabiochem
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
Sodium orthovanadate	Sigma
Sodium chloride (NaCl)	VWR Life Science
SYBR Safe	Intitrogen
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AMRESCO
Thioflavin S (ThS)	Sigma
Thioflavin T (ThT)	Sigma



Trifluoroacetic acid 99% (TFA)	Alfa Aesar
Triisopropylsilane (TIS)	Sigma
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	VWE Life Science
Tryptone	Bertec
Tween 20	Sigma
Uranyl acetate (UA)	中研院分生所
Yeast extract	Bertec
β -Mercaptoethanol	Sigma

2.1.3 細菌品種 (bacteria strain)

我們使用的菌種為 *E.coli* BL21 (DE3) 和 *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies)，一開始使用的都是 BL21 (DE3)，後來改成使用 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 以希望能增加蛋白質產量，因為 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 帶有較多的稀少 tRNA 基因，可以增加其他物種的蛋白質表現量。

2.1.4 培養基 (medium)

(1) LB 瓊脂平板 (agar plate)

含有 1% tryptone、1% NaCl、0.5% yeast extract 及 1.5% agar，配置好溶液後經高壓滅菌，待其冷卻後加入氨苄青黴素 (Ampicillin) 使其濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，混合均勻後再倒入空的培養皿中，凝固後即可使用。

(2) LB 培養基 (LB medium)

含有 1% tryptone、1% NaCl 及 0.5% yeast extract，配置好溶液後經高壓滅菌，待其冷卻後加入 Ampicillin 使其濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及硫酸鎂 (magnesium sulfate, MgSO_4) 使其濃度為 2 mM，混合均勻後即可使用。



2.1.5 tau / p-tau 質體 (plasmid)

實驗所用來表現 tau / p-tau 的質體由美國密西根州立大學生化分生所郭敏豪老師實驗室提供，p-tau 的質體可以表現出兩種蛋白，分別為 His6 tag-Fos-Thrombin-GSK 和 Jun-TEV-Tau，Jun 和 Fos 透過蛋白質之間的作用力亮氨酸拉鍊 (leucine zipper) 而靠近，使 GSK 可以對 tau 進行磷酸化作用，產生 p-tau；而 tau 的質體只缺少了 GSK，用這兩種質體即可在細菌中表現出 tau/p-tau。

2.1.6 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)

上膠 (stacking gel) 含有 5% 丙烯醯胺 (acryamide)，下膠 (separating gel) 含有 10% acryamide，使用 1 mm 厚度的玻璃片製作，以供後續進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 時使用，若沒有當日使用，則放在去離子蒸餾水中，保存在 4°C 冰箱。

2.1.7 實驗儀器

(1) 紫外光可見光分光光譜儀 Beckman Coulter DU-800 spectrophotometer

測量菌液及蛋白質濃度

(2) 螢光光譜儀 JASCO FP-750 spectrophotometer

測量樣品有無澱粉樣纖維生成

(3) 微量冷凍離心機 KUBOTA 3520 centrifuge

純化時用以沉澱不要的蛋白質及沉澱澱粉樣纖維



(4) 離心機 Beckman Coulter AllegraTM X-12R centrifuge
搭配濃縮離心管來濃縮蛋白質及置換緩衝溶液 (buffer)

(5) 高速離心機 Beckman Coulter Avanti J-20/Avanti J-25/Avanti J-26XP centrifuge
使菌液沉澱

(6) 超音波細胞打碎機 Hielscher UP200H ultrasonic homogenizer
打碎細菌使蛋白質釋出；製備種晶

(7) 超音波洗淨器 Branson 3510
製備種晶

(8) 加熱型單槽乾浴器 Major Science MD-01N Genius Dry Bath Incubator
用以加熱樣品

(9) 迴轉式振盪器 Orbital Shaker OS701
使樣品均勻混合

(10) 快速蛋白液相層析儀 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)
使用的管柱為 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column，純化 tau 及
p-tau

(11) 逆向 - 高效液相層析儀 Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
使用的管柱為 SUPELCO Discovery[®] BIO Wide Pore C18 column，純化胜肽



(12) 微量盤螢光分光光譜儀 Gemini EM Microplate Spectorfluorometer

監測澱粉樣纖維的生成

(13) 胜肽合成儀 PS3TM peptide synthesizer (Protein Technologies, Inc.)

合成胜肽

(14) 冷凍乾燥機 Uniss FDM-20 Manifold Freeze Dryer

將急速冷凍的胜肽抽乾成粉末

(15) 基質輔助雷射脫附游離一時間式飛行質譜儀 Bruker AutoFlex III smartbeam

TOF/TOF200 Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass

Spectrometry (中央研究院分子生物研究所質譜室設施)

測量合成及純化後的胜肽質量是否正確

(16) 場發射槍穿透式電子顯微鏡 FEG-TEM, FEI Tecnai G2 TF20 Super TWIN (中

央研究院細胞與個體生物學研究所公共儀器影像組設施)

觀察並拍攝澱粉樣纖維圖像

(17) 傳立葉轉換電場軌道阱複合式質譜儀 Elite Thermo Orbitrap Elite Mass

Spectrometer

測量純化後的 p-tau 帶有多少磷酸根

(18) 多功能生物冷光暨螢光影像分析系統 FUJI LAS-4000

觀察進行西方墨點法的轉印膜上是否有目標蛋白



(19) 安全電泳膠觀察箱 YOU-LUM SKY-A2BOX

觀察瓊脂膠體 (agarose gel)

(20) 圓二色光譜儀 JASCO J-815 Circular dichroism spectroscopy

測量胜肽二級結構

(21) 粒徑量測儀器 Malvern Zetasizer Nano ZS

測量蛋白質粒徑大小

2.2 方法

2.2.1 表現與純化 tau / p-tau

(1) 製備表現 tau / p-tau 的細菌

利用熱休克轉型法 (heat-shock transformation) 將 tau / p-tau 質體送入勝任細胞。首先將 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 勝任細胞從 -80°C 冰箱取出並放置於冰上，並把 agar plate 先放到 37°C 培養箱預熱，取 2.5 μl 濃度約為 100 ng/μl 的質體和 25 μl 的勝任細胞在微量離心管 (eppendorf) 中均勻混合，放入 42°C 的加熱型單槽乾浴器 45 秒，再放在冰上 2 分鐘，用四區劃碟法 (Streaking Method) 將菌液塗至 agar plate 上，放置 37°C 培養 12-16 小時，取得含有可表現 tau / p-tau 的單一菌落細菌。

(2) 培養並表現 tau / p-tau

先將可以表現 tau / p-tau 的細菌從 agar plate 上挑出來，培養在含有 Ampicillin 及 MgSO₄ 的 100 ml LB 培養基中，在 37°C 培養箱中以 230 rpm 轉速培養 12-16 小時，當作小量培養菌液，接著從小量培養菌液取出 3 ml 加到 1 L



的 LB 培養基，在 37°C 培養箱中以 230 rpm 轉速培養約 4-5 小時使其在 600 nm 的吸光值 (optical density, OD) 達到 0.3-0.4，此時加入異丙基-β-D-硫代半乳糖昔 (Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 使其濃度為 0.1 mM，用以誘導細菌開始表現 tau / p-tau，並繼續培養 2 小時，培養結束後在 4°C 下以轉速 6000 g 離心 10 分鐘，倒掉上清液 (supernatant) 並將細菌沉澱塊 (pellet) 放置 -80°C 冰箱中保存。

(3) 純化 tau / p-tau

先製備含有 20 mM Tris、100 mM NaCl 且 pH 值為 5.8 的破菌溶液 (lysis buffer)，將細菌 pellet 從 -80°C 冰箱取出，加入 7 ml 的破菌溶液 (lysis buffer)，用移液器 (pipette) 以吸吐的方式讓 pellet 完全懸浮在溶液中形成菌液並移到試管，此時體積大約為 10 ml，加入不同藥品使其最後達到 1 mg/ml lysozyme、1 mM PMSF、1 mM EDTA、0.2 mM orthovanadate 和 1 錠 Roche protease inhibitor，混合均勻後將菌液靜置在 30°C 培養箱 45 分鐘，每 10 分鐘輕微搖晃試管，接著放在冰上 5 分鐘以降溫，接著使用超音波細胞打碎機來震破細菌，接上 3 mm 的微探針 (microtip) 並以 30% 強度且週期為 0.5 秒的條件進行 10 分鐘，破完菌後在 4°C 下以轉速 17000 g 離心 40 分鐘，取出上清液，放在沸水中隔水加熱 30 分鐘，再放在冰上冷卻 30 分鐘，接著在 4°C 下以轉速 20000 g 離心 50 分鐘，取出上清液，測量 OD₂₈₀ 來計算要加入多少量的 TEV 蛋白酶 (TEV protease)，TEV protease 將 tau / p-tau 從 Jun-TEV-Tau 融合蛋白上切割下來，同時加入 DTT 使其濃度為 1 mM，將樣品放在 shaker 上輕微搖晃，在室溫下讓 TEV 蛋白酶反應 12-16 小時，反應後在 4°C 下以轉速 20000 g 離心 30 分鐘，取出上清液，以 0.22 μm 過濾膜過濾樣品，接著使用 Amicon 10 kD 濃縮離心管 (spin column) 濃縮樣品並做緩衝液的交換 (buffer exchange)，首先將樣品在 4°C 下以轉速 3700 g 離心 10-20 分鐘，使其體積小於 2 ml，接著加入 5 ml 含有 20 mM Tris、100



mM NaCl 且 pH 值為 7.4 的 FPLC 溶液 (FPLC buffer)，再進行一次離心，並重複此步驟兩次，使最後體積小於 2 ml，將此樣品打入 FPLC 儀器中，利用 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 分離不同大小分子量的蛋白質以達到純化目的，使用 FPLC buffer 沖提 (elute) 約 400 分鐘，流速設定為 0.3 ml/min，依據 UV_{215nm} 、 UV_{254nm} 、 UV_{280nm} 進行監測，將不同時間收集下來的樣品利用 SDS-PAGE 分析，觀察哪一些樣品含有 tau / p-tau，將這些樣品以 Amicon 10 kD 濃縮離心管濃縮，即得到純化後的 tau / p-tau，加入甘油 (glycerol) 使其濃度為 10%，在 4°C 下以轉速 20000 g 離心，取出上清液，分裝後以液態氮急速冷凍，保存在 -80°C 冰箱之中。

(4) 利用 SDS-PAGE 鑑定樣品狀況

取 8 μ l 的樣品加入 3 μ l 的 5X sample buffer 進行混合，接著放置 100°C 乾浴槽加熱 10 分鐘，將此樣品注入 10% 1 mm SDS-PAGE 膠的格子中，以固定 150-200 V 的電壓下進行電泳，並隨時注意樣品在膠中的狀況，結束後再用 coomassie blue 進行染色大約 20 分鐘，再利用水、甲醇、醋酸依照 7:2:1 的比例配製而成的退染溶液 (destain buffer) 進行退染，即可觀察膠片。

(5) 定量 tau / p-tau 的濃度

將純化後的 tau / p-tau 樣品從 -80°C 取出並放在冰上以防止有部分 tau / p-tau 聚集 (aggregation)，準備濃度為 0.2、0.4、0.6、0.8 mg/ml 的牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)，從 tau / p-tau 及不同濃度的 BSA 取 2 μ l 加入 6 μ l 的水，和 3 μ l 的 5X sample buffer 混合均勻，放入乾浴槽以 100°C 加熱 10 分鐘，接著將樣品注入 SDS-PAGE 膩的格子中，進行 SDS-PAGE，再使用 ImageJ 圖像分析軟體和 Excel 試算表軟體進行分析，比較 tau / p-tau 和 BSA 的條帶大小及深淺，即可用已知濃度的 BSA 做一回歸曲線圖，用以定量 tau / p-tau 濃度。

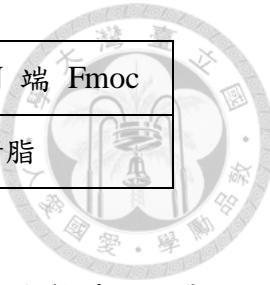


2.2.2 胜肽合成

實驗中用到的所有胜肽都是以 PS3 胜肽合成儀合成的，並且使用固相聚醯胺合成法 (solid-support fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-polyamide) 進行合成，制備的原料包含 N 端帶有 Fmoc 保護基的胺基酸衍生物、當作載體的 Wang resin/Rink amide resin 和作為催化劑的 HCTU，三者之間的比例為 0.4 mmole : 0.1 mmole : 0.4 mmole。在合成過程中，前一個胺基酸 N 端上的 Fmoc 會先被移除，緊接著 HCTU 會和下一個胺基酸上的羧基進行反應而形成較高活性的酯基，酯基可以提高親核攻擊反應而作用在前一個胺基酸上的胺基，使兩者之間形成胜肽鍵結，重複此動作即可進行胜肽鏈的延長，並在最後再進行一次去保護的步驟將最後一個胺基酸上的保護基去除。合成中所使用的主要溶劑為 DMF、去保護試劑 (deprotection reagent, DEP) : 30% (v/v) piperidine、70% (v/v) DMF 和活化試劑 (activation reagent, ACT) : 4.45% (v/v) NMM、25% (v/v) DMSO、70.55% DMF，依照下列表格設計的反應步驟來進行胜肽的合成。

步驟	藥品	反應時間	反應次數	反應目的
1	DMF	30 分鐘	1	浸泡樹脂、增加反應表面積
2	DMF	30 秒	3	清洗樹脂
3	DEP	15 分鐘	2	去除胺基酸 N 端 Fmoc
4	DMF	30 秒	6	清洗樹脂
5	ACT	30 秒	1	活化下一個反應的胺基酸
6	AA mix	3-10 小時	1	胺基酸形成胜肽鍵
回步驟 2 繼續反應接上下一個胺基酸，若已經接上 最後一個胺基酸，則往下走步驟 7 進行樹脂的清洗				
7	DMF	30 秒	3	清洗樹脂
8	DMF	30 秒	3	清洗樹脂

9	DEP	15 分鐘	2	去除胺基酸 N 端 Fmoc
10	DMF	30 秒	6	清洗樹脂



合成結束後，依序使用 DMF、乙醇、DCM 去清洗，並用真空乾燥器將殘餘的溶劑抽乾。接著要將勝肽從 resin 上切除下來並移除胺基酸側鏈上的保護基，將 TFA、水、EDT、TIS 四種溶液以 94 : 2.5 : 2.5 : 1 (總體積 10 mL) 的比例混和成切除反應溶液並加入磁石攪拌器，勝肽在試劑中攪拌反應 3 小時，EDT 能抑制由酸催化的 methionine 氧化反應 (acid-catalyzed methionine oxidation)，並且除去 cysteine 上的三苯甲基 (trityl group) 側鏈保護基，而 TIS 的功能為避免胺基酸側鏈上的保護基在進行切除反應時所產生的陽離子又接回去原來的位置，接著用過濾的方式分離勝肽與 resin，並用冷卻的 MTBE 將勝肽析出，在 4°C 下以轉速 10000 g 離心 15 分鐘使勝肽沉澱，倒掉 MTBE 後重複同樣的步驟兩次，藉此清洗掉殘留再樣品中的切除反應試劑，最後利用真空乾燥器將樣品抽乾去除 MTBE，即可得到粗製的勝肽粉末 (crude peptide powder)。

2.2.3 勝肽純化與鑑定

將合成後的勝肽粉末溶解在水中，以逆向-高效液相層析儀進行純化，使用 C18 管柱，純化時使用的 buffer 有兩種，分別為 buffer A (94.9% 水 / 5% acetonitrile / 0.1% TFA) 和 buffer B (99.9% acetonitrile / 0.1% TFA)，調整兩種 buffer 的混合比例用以沖提勝肽，流速設定為 3 ml/min，即可依照樣品中勝肽親疏水性值的不同而達到分離純化效果，根據 UV₂₂₀ 對樣品進行監測，用以決定蒐集哪個吸收峰 (peak)，將收集下來的樣品送至中研院分子生物研究所質譜室分析，確認是否收下的樣品含有純的目標產物，最後再用冷凍乾燥機將樣品抽乾成粉末並放在 -30°C 冰箱保存。



2.2.4 西方墨點法 (western blot)

用西方墨點法來確認純化後的樣品是否確實含有 tau / p-tau，先進行 SDS-PAGE，並利用半乾式轉漬器將蛋白質從膠片轉漬到轉印膜上，接著進行阻攔 (blocking) 反應步驟，將轉印膜放入阻攏溶液在室溫搖晃反應 1 小時，降低非特定蛋白結合上轉印膜，減少錯誤的機率。接著倒掉阻攏溶液並利用 TBST 溶液清洗三次，並進行一級抗體 (1st antibody) 反應步驟，使用的抗體為 Anti-Tau-1, clone PC1C6 antibody，將轉印膜放入一級抗體溶液在室溫搖晃反應 1.5 小時，使一級抗體和目標蛋白結合。接著倒掉一級抗體溶液並利用 TBST 溶液清洗三次，最後進行二級抗體 (2nd antibody) 反應步驟，使用的抗體為 Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)，將轉印膜放入二級抗體溶液在室溫搖晃反應 30 分鐘，使二級抗體辨識一級抗體並結合，接著倒掉二級抗體溶液並利用 TBST 溶液清洗三次，最後加入 ECL 冷光試劑，使用多功能生物冷光暨螢光影像分析系統儀器觀察轉印膜上是否有 tau / p-tau。

2.2.5 以動態光散射測量蛋白質粒徑大小

利用不同粒子大小有不同的散射情況來分析樣品中的蛋白質粒徑，在 cuvette 中加入 600 μl 的樣品，設定波長為 633 nm 的紅光並在 173° 位置進行散射的偵測，在 25°C 條件下進行三重複測量。

2.2.6 p-tau 的液相層析-串聯式質譜分析

將 p-tau 樣品溶解在含有 2 mM DTE、8 M 尿素及 25mM 的 ABC 的溶液中反應一小時使 p-tau 展開，接著加入 20 mM 碘乙醯胺，在避光條件下反應一小時，加入 LysC 限制酶使其和 p-tau 的比例為 1:50，在 37°C 條件下反應 4 小時，再加入一定體積的 25 mM ABC 使尿素濃度低於 1 M，隨即加入胰蛋白酶使其和 p-tau 的比例為 1:50，在 37°C 條件下反應 16 小時，最後加入 1% 甲酸終



止酵素反應，並用 Zip-tip 吸附經酵素剪切過後的胜肽片段，以 50% acetonitrile 沖提使胜肽從 Zip-tip 上被沖提下來，送入質譜儀器進行序列分析，最後使用 Mascot® 軟體進行分析，並以 NCBI 的蛋白質資料庫進行序列比對。

2.2.7 以圓二色光譜儀測量胜肽二級結構

將 200 μl 的樣品放入 1 mm 光徑的石英光析管，在室溫下進行測量，由 190 nm 至 260 nm 的波長範圍進行掃描，並以 0.5 nm 為測量區間，進行 2 次測量，最後依據光譜圖形來判斷樣品的二級結構。

2.2.8 tau / p-tau / 胜肽聚集測試 (aggregation test)

tau 和 p-tau 使用微量盤螢光分光光譜儀進行測試，製備含有 20 mM Tris 的 aggregation buffer，將要測試的樣品和不同量的 aggregation buffer 混合，配製不同濃度的樣品，並加入螢光染劑 ThS 使其濃度為 20 μM ，每一個樣品總體積為 30 μl ，並且每一個樣品都做三重複，製備好樣品後把樣品注入 384 孔盤，並將孔盤放入微量盤螢光分光光譜儀之中，設定溫度 37°C，以 440 nm 激發光 (excitation) 激發並接收 520 nm 散發光 (emission)，在儀器中進行動態測量 (kinetics)，即邊培養澱粉樣纖維邊測量螢光訊號，觀測螢光訊號隨著培養時間的變化來判斷樣品有無 aggregation 形成澱粉樣纖維。

胜肽及種晶實驗和胜肽抑制物的測試則使用螢光光譜儀進行測試，製備和上述微量盤螢光分光光譜儀相同條件的樣品進行測量，但是樣品體積為 100 μl ，激發光光柵設定 5 nm 而發散光光柵設定 10 nm，以 442 nm 的激發光激發，並接收 450 nm 到 600 nm 的發散光訊號，藉此偵測有無澱粉樣纖維的形成。



2.2.9 種晶的製備

將含有 p-tau 纖維的樣品以轉速 20000 g 離心 60 分鐘使纖維沉澱，接著取出上清液並加入 100 μl 的水，擾動使纖維懸浮以清洗，以同樣條件去離心並取出上清液，加入 40 μl 的水並擾動使纖維懸浮，使用超音波細胞打碎機去打斷纖維，用 1 mm 的微探針以 20% 強度且週期為 0.6 秒的條件進行去使其形成種晶，每進行 5 秒即休息 5 秒以免樣品過熱，總共進行 100 秒，最後將第一次離心取出的上清液拿去進行 SDS-PAGE 用以定量 seed 的濃度；tau 的種晶則是使用超音波洗淨器製備，在冰浴中震 30 分鐘即完成。

2.2.10 以場發射槍穿透式電子顯微鏡觀察 fibril 的圖像

先將 10 μl 的樣品滴到 300 目數銅製網格片 (300-mesh copper grid) 的碳面上並靜置 3 分鐘，利用濾紙吸去液體後，再把 10 μl 的 1% 醋酸鈾 (uranyl acetate, UA) 滴到網格片上靜置 15-60 秒，同樣使用濾紙吸去液體，最後將網格片放入防潮箱靜置一晚，隔天即可上機觀察樣品。

第三章 結果

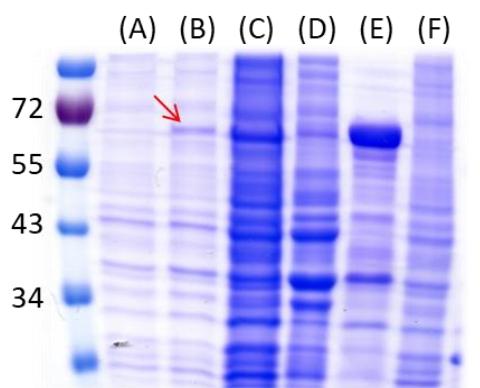


3.1 tau 的製備

首先我們先使用 tau 來進行純化，確定了純化方式後再以同樣方式來純化 p-tau。在利用細菌表現 tau 之後，依照破菌、煮沸、TEV protease 處理、通過管柱的順序來進行純化，純化後使用濃縮離心管濃縮並加入 glycerol 儲存在 -80°C 環境中保存，並在每一個純化步驟後保留約 20 μl 的樣品，用 SDS-PAGE 來檢驗每一個純化步驟之後，樣品是否含有 tau，並在最後使用 BSA 來定量 tau 的濃度。

一開始培養細菌進行 tau 的表現時，在加入 IPTG 誘導細菌開始表現 tau 的前後都有預留 1 ml 的菌液，之後可以利用 SDS-PAGE 來比較判斷是否有成功表現 tau。純化時先破菌並用沸水隔水加熱樣品，接著先做一次 SDS-PAGE 凝膠電泳來確認表現及初步純化步驟是否正確，首先將表現 tau 前後的菌液以轉速 20000 g 離心 5 分鐘將 pellet 沉澱下來，並加入比例為 1 : 2 的 lysis buffer，當作表現前後的樣品，並連同在純化後的每一個步驟留下來的樣品一起進行凝膠電泳（圖 3.1），由結果來看細菌在以 IPTG 誘導後確實是有表現 tau，經由破菌和加熱後也存在在樣品之中。

加熱及離心之後，取出的上清液體積約為 15 ml，接著取出樣品 10 μl 加入 990 μl 的 lysis buffer 之中，以此稀釋 100 倍的樣品進行全波長吸光值測量（圖 3.2），結果 OD₂₈₀ 為 0.9742，接著要決定該加入多少 TEV protease，TEV protease OD₂₈₀ 為 0.7627，濃度為 1.29 mg/ml，各取 500 μl 的樣品並分別加入 100 / 80 / 50 / 30 / 10 / 1 μl 的 TEV protease，在室溫下反應 12-16 小時，再進行 SDS-PAGE 並判斷多少量的 TEV protease 即可和全部的 tau 反應，由結果來看需要至少 10 μl 才能對全部的 tau 作用，在僅加入 1 μl 的組別中，還有一點點 tau 沒有反應完全（圖 3.3），因此之後的 TEV protease 反應步驟都依照此比例進行。



- (A) : 誘導表現蛋白前
(B) : 誘導表現蛋白後
(C) : 破菌完離心後的上清液
(D) : 破菌完離心後的沉澱塊
(E) : 加熱完離心後的上清液
(F) : 加熱完離心後的沉澱塊

圖 3.1 純化 tau 的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A) 誘導表現蛋白前、(B) 誘導表現蛋白後、(C) 破菌完離心後的上清液、(D) 破菌完離心後的沉澱塊、(E) 加熱完離心後的上清液、(F) 加熱完離心後的沉澱塊。紅色箭頭指的即為 tau。

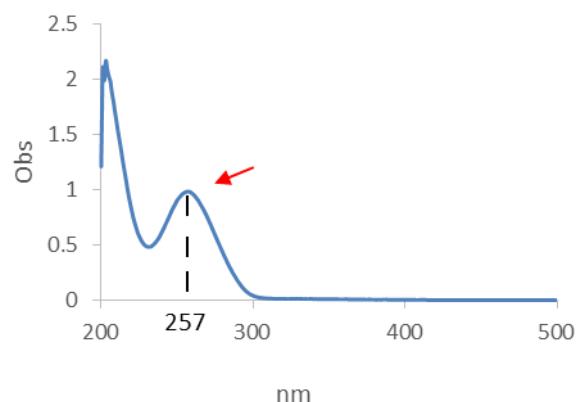


圖 3.2 加熱完的 tau 樣品稀釋 100 倍進行全波長的吸光值測量圖。

縱軸為吸光值，橫軸為波長。 $UV_{280\text{nm}}$ 為 0.9742，但在 $UV_{257\text{nm}}$ 有一吸收峰，懷疑樣品中含有核酸汙染。

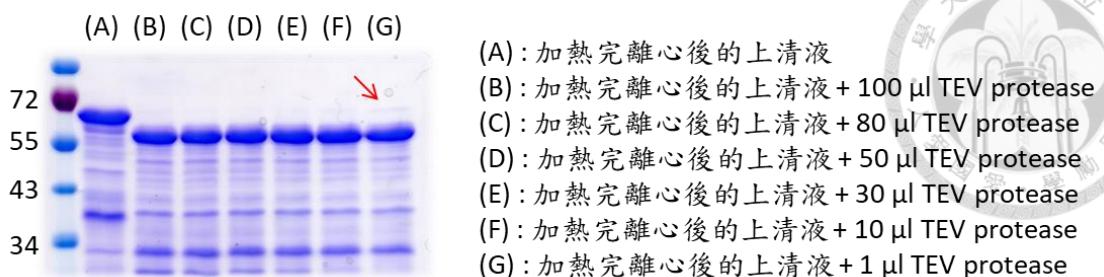


圖 3.3 tau 和不同量 TEV protease 反應後的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 (A) 加熱完離心後的上清液、(B)-(G) 加熱完離心後的上清液加入不同量的 TEV protease。紅色箭頭指出在組別 (G) 中還殘留一點 tau 沒有被 TEV protease 作用。

經過 TEV protease 反應後將樣品濃縮並置換 buffer，再把樣品注入 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 中，利用 FPLC 進行純化 (圖 3.4)，收集 50-65 ml 處 (fraction 50-65)，並將收集下來的樣品進行 SDS-PAGE 分析哪些收集管中含有 tau (圖 3.5)，結果 tau 在 fraction 50-61 之中，將這些 fraction 混合在一起並濃縮至 1 ml，並再進行一次 SDS-PAGE 查看純化是否正確 (圖 3.6)，在 tau 的 band 下方還有一些雜 band，可能為 tau 的降解產物。

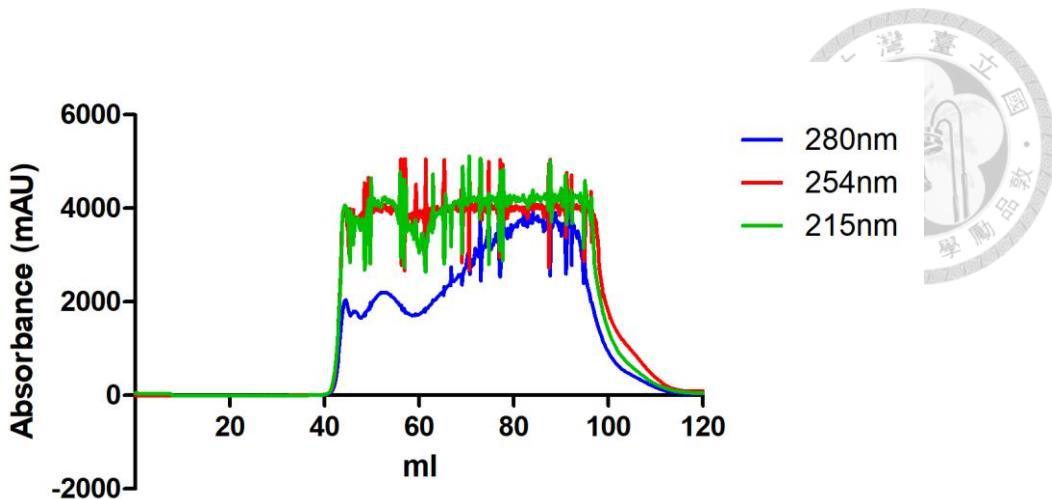


圖 3.4 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 UV_{280nm} 、紅線代表 UV_{254nm} 、綠線代表 UV_{215nm} 。以 FPLC buffer 沖提 120 ml，收集 50-65 ml 的樣品，但 UV_{254nm} 的訊號異常的高，推測樣品中有核酸汙染，和先前全光譜吸光值測量的結果相應。

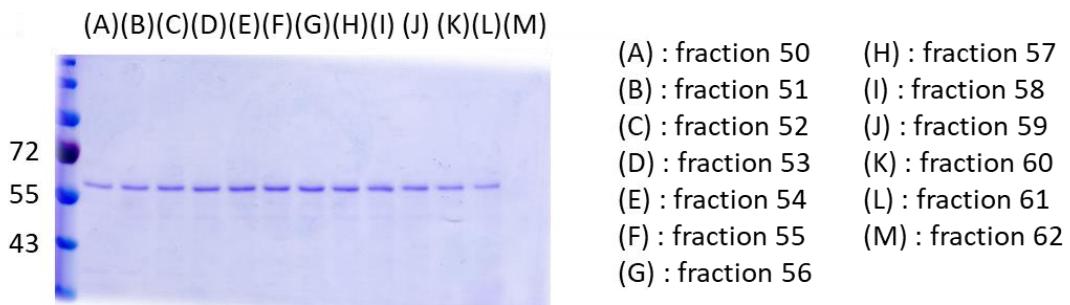


圖 3.5 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A)-(K) 分別為 fraction 50-62。可以看到 tau 位於 fraction 50-61 之中。

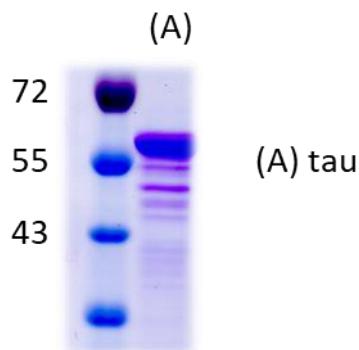


圖 3.6 將 FPLC fraction 集中並濃縮後的 tau SDS-PAGE 圖。

(A) 為濃縮後的 tau，含有一些雜 band，推測為 tau 的降解產物。

為了降低 tau 的降解，我們參考一篇論文採用直接煮沸法 (directly boil method)，省略破菌的步驟，將菌塊加入 lysis buffer 之後直接利用加熱 20 分鐘，再放在冰上冷卻 10 分鐘，隨即在 4°C 下以轉速 13000 g 離心並取上清液，用此方法同時破菌和純化 (KrishnaKumar and Gupta 2017)，隨即利用 SDS-PAGE 確認破菌效果及純化效率 (圖 3.7)，把結果和之前先利用 lysozyme 和超音波來破菌的效果比較，確實減少了 tau 的降解，但這種直接煮沸法的破菌效果並沒有比較好。

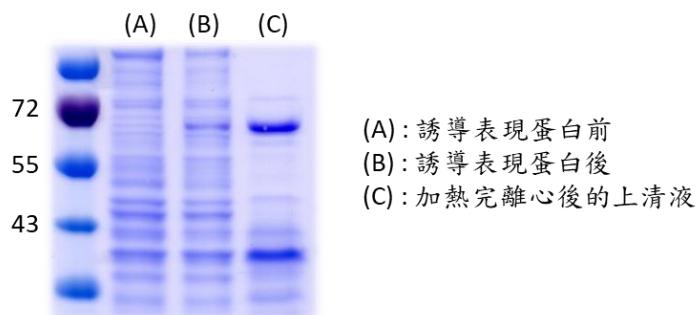


圖 3.7 用直接煮沸法同時破菌並純化 tau 的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 (A) 誘導表現蛋白前、(B) 誘導表現蛋白後、(C) 加熱完離心後的上清液。tau 的降解產物減少了，但負面影響是破菌效果變差而使 tau 的量降低。在 (C) 中上面的 band 為 tau，下面的 band 則推測為細菌表現出的另一種抗熱蛋白。



為了改善直接煮沸法會導致破菌效果較低的情形，我們決定同時利用液態氮冷凍破菌法和直接煮沸法來同時進行破菌和純化，將菌液放入液態氮中急速冷凍 5 分鐘，再加熱 15 分鐘，以 20 分鐘為一循環，總共做了三次循環，再離心並取上清液體，接著利用 SDS-PAGE 確認破菌及純化效果（圖 3.8），由結果可以發現 tau 的量比直接煮沸法來的多，代表破菌效果較好。

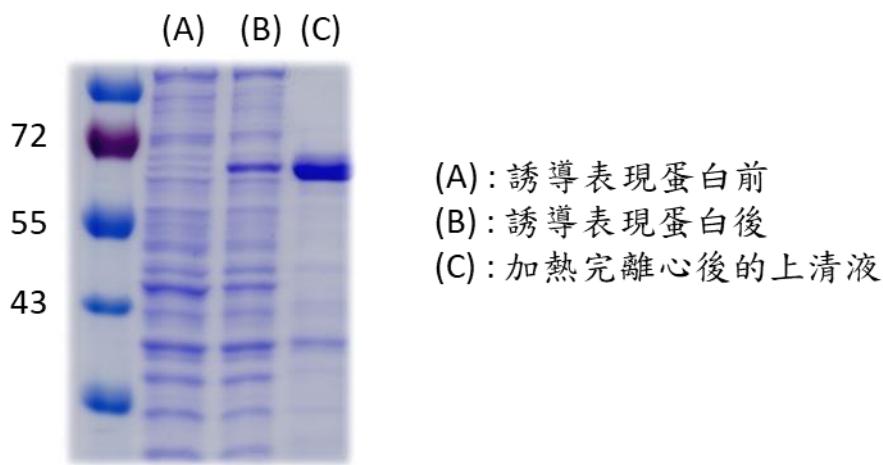


圖 3.8 用冷凍破菌法和直接煮沸法同時破菌並純化 tau 的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 (A) 誘導表現蛋白前、(B) 誘導表現蛋白後、(C) 加熱完離心後的上清液。結果可以看出破菌效果比直接煮沸法好。

接著我們將樣品同樣接著以 TEV protease 處理和利用 FPLC 純化，但測量吸光值時在 UV_{257nm} 依然有吸收峰，且進行 FPLC 純化時依然有很高的 UV_{254nm} 訊號，因此我們先將純化後的 tau 分裝，並分別加入一點點的 DNase 和 RNase，在室溫下反應 1 小時，隨即利用瓊脂膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 來分析樣品，首先混合 0.36 g 的 agarose、3 μ l SYBR safe DNA gel stain 和 30 ml 的 TAE buffer 製作出 1.2% agarose gel，接著將樣品注入 agarose gel 的格子中，以 100 V 的電壓進行電泳，隨後以安全電泳膠觀察箱進行觀察，若有螢光訊號代表樣品中含有 DNA 或 RNA（圖 3.9），由結果可以看出樣品中確實含有 DNA 或



RNA，而且在加了 RNase 處理過後，螢光訊號的條帶往低分子量的地方移動了，而使用 DNase 處理的樣品卻沒有變化，代表樣品中含有的核酸汙染來源是 RNA。

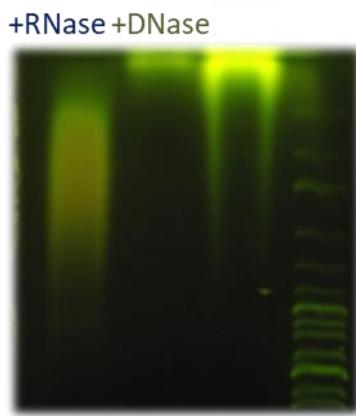


圖 3.9 鑑定 tau 樣品中是否含有核酸汙染的 agarose gel 圖。

膠片上由右至左為 marker、tau、被 DNase 處理過後的 tau、被 RNase 處理過後的 tau，且 marker 由上至下為分子量由大到小。由 tau 表現的螢光訊號代表樣品含有核酸汙染，綜合 DNase / RNase 處理的結果，可推論樣品含有的是 RNA。

為了去除 RNA，我們嘗試使用 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱來去除 RNA, tau 經冷凍破菌法和直接加熱法初步純化，並由 TEV protease 處理，接著將樣品注入 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱，流速設定為 1 ml/min，一開始使用 FPLC buffer 沖提 25 分鐘，之後使用含 500 mM NaCl、20 mM Tris 且 pH 值為 7.4 的高鹽 buffer 沖提 75 分鐘，並調整梯度在前 40 分鐘由 0 % 拉至 100 %，利用高濃度的 Na^+ 和 tau 競爭使 tau 從帶有負離子的樹脂上離開被沖提出來，並收集純化過程的樣品，由結果可以得到兩個吸收峰（圖 3.10），將吸收峰的樣品以 SDS-PAGE 確認是否為 tau（圖 3.11），結果可以看出第二個吸收峰為 tau，而第一個吸收峰並不含蛋白質，隨即我們對吸收峰二的 tau 進行 agarose gel electrophoresis，結果沒有任何螢光訊號（圖 3.12），代表樣品中的 RNA



成功被去除，接著測量其吸收光譜，發現在 UV_{257nm} 的強訊號消失了，並在 UV_{275nm} 處有些微訊號（圖 3.13），代表 RNA 確實被移除了。除去了 RNA 之後，我們將樣品濃縮並再次利用 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 進行純化，而得到一個沒有 RNA 訊號的吸收峰（圖 3.14），將此吸收峰的樣品濃縮並利用 SDS-PAGE 進行分析，證實了樣品中確實是沒有 RNA 的 tau（圖 3.15），在樣品中加入 glycerol 即可放在 $-80^{\circ}C$ 中保存。確定了純化步驟後，我們在後續以同樣的純化步驟來純化 p-tau。

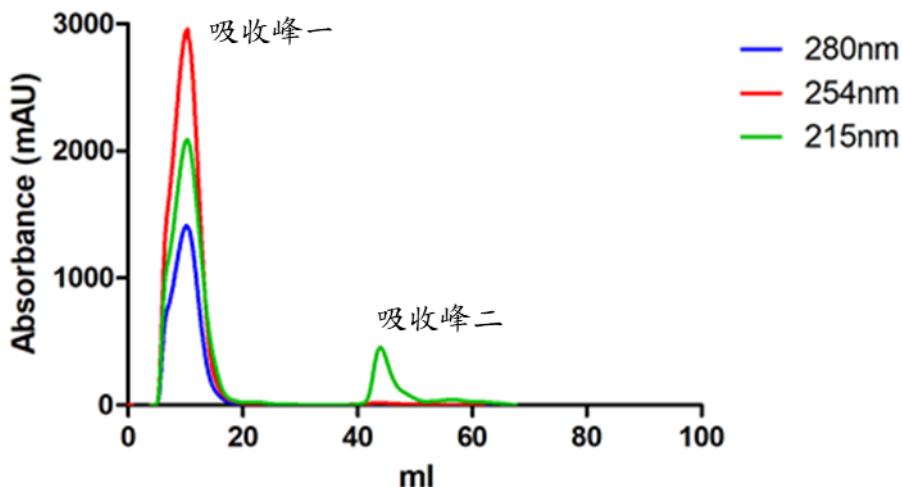


圖 3.10 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 UV_{280nm} 、紅線代表 UV_{254nm} 、綠線代表 UV_{215nm} 。以 FPLC buffer 和高鹽 buffer 沖提 100 ml，經過管柱純化後可以得到兩個吸收峰，前者為吸收峰一；後者為吸收峰二，利用 SDS-PAGE 分析可以知道哪一個為 tau。

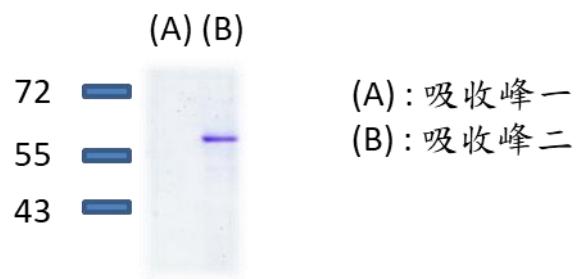


圖 3.11 將 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後收集的兩個吸收峰進行 SDS-PAGE 分析圖。

膠片上由左至右為吸收峰一、吸收峰二，可以看出吸收峰一中不具有蛋白質，推測可能為 RNA，而吸收峰二則是 tau。

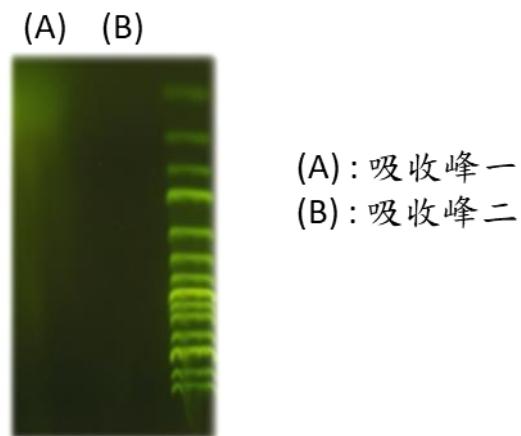


圖 3.12 將 tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後收集的兩個吸收峰進行 agarose gel electrophoresis 分析圖。

膠片上由右至左為 marker、吸收峰二、吸收峰一。吸收峰一帶有螢光訊號而吸收峰二沒有，代表吸收峰一中含有 RNA，而吸收峰二中的 tau 已不帶有 RNA。

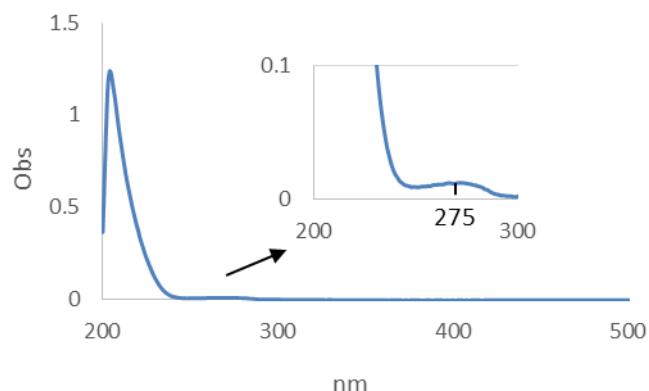


圖 3.13 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後的 tau 進行全波長的吸光值測量圖。

縱軸為吸光值，橫軸為波長。原本很高的 UV_{257nm} 峰值消失了，只有 UV_{220nm} 有吸收峰，且 UV_{275nm} 有一點點吸收，因為 tau 含有 Tyr，此圖證明了樣品中含有沒受核酸汙染的蛋白質。

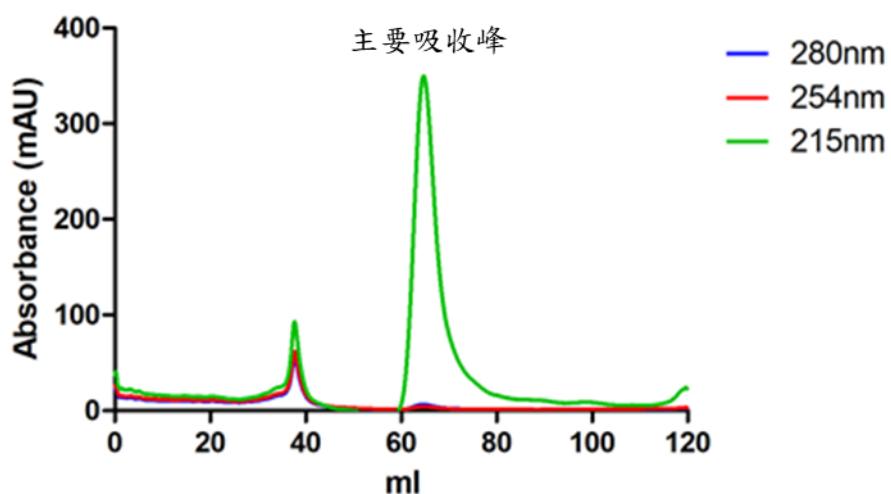


圖 3.14 去除 RNA 的 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 UV_{280nm} 、紅線代表 UV_{254nm} 、綠線代表 UV_{215nm} 。以 FPLC buffer 沖提 120 ml，主要的吸收峰為 tau。

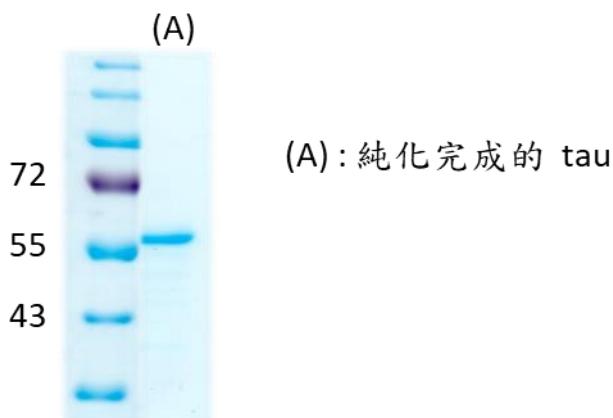


圖 3.15 純化完成的 tau 的 SDS-PAGE 圖。

以改良後的方法來純化 tau，可以減少降解並去除 RNA。

3.2 p-tau 的製備

我們使用和純化 tau 一樣的方法來進行純化。在利用細菌表現 p-tau 之後，依照冷凍破菌法、直接煮沸法、TEV protease 處理、通過兩種管柱的順序來進行純化，純化後使用濃縮離心管濃縮並加入 glycerol 儲存在 -80°C 環境中保存，並在每一個純化步驟後保留約 20 μl 的樣品，用 SDS-PAGE 來檢驗每一個純化步驟之後，樣品是否含有 p-tau，並在最後使用 BSA 來定量 tau 的濃度。

首先使用細菌表達 p-tau，接著將 pellet 溶在 lysis buffer 中並利用冷凍破菌法和直接煮沸法進行破菌同時進行初步純化，接著測量其吸收光譜，可以發現在 UV_{257nm} 有強訊號（圖 3.16），代表樣品中有核酸汙染，將樣品經 TEV protease 處理並先通過 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱以去除 RNA，結果和 tau 的純化相似，在 FPLC 結果上可以看到有兩個吸收峰（圖 3.17），其中第二個吸收峰為 p-tau，將收下來的樣品測量其吸收光譜，可以得到在 UV_{220nm} 有吸收峰且 UV_{275nm} 有些許吸光值的結果（圖 3.18），證實了樣品中帶有不具核酸汙染的蛋白質的 p-tau，接著利用 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 進行純化，可以得到沒有 RNA 訊號的吸收峰（圖 3.19），最後利用 SDS-PAGE 進行分析，



證實了樣品中確實是沒有 RNA 的 p-tau (圖 3.20)，在樣品中加入 glycerol 即可放在 -80°C 中保存。

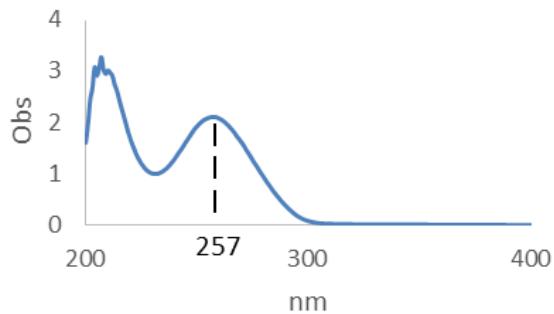


圖 3.16 經冷凍破菌法和直接加熱法處理完的 p-tau 樣品稀釋 100 倍進行全波長的吸光值測量圖。

縱軸為吸光值，橫軸為波長。在 $UV_{257\text{nm}}$ 有極強的訊號，代表此樣品中具有核酸污染。

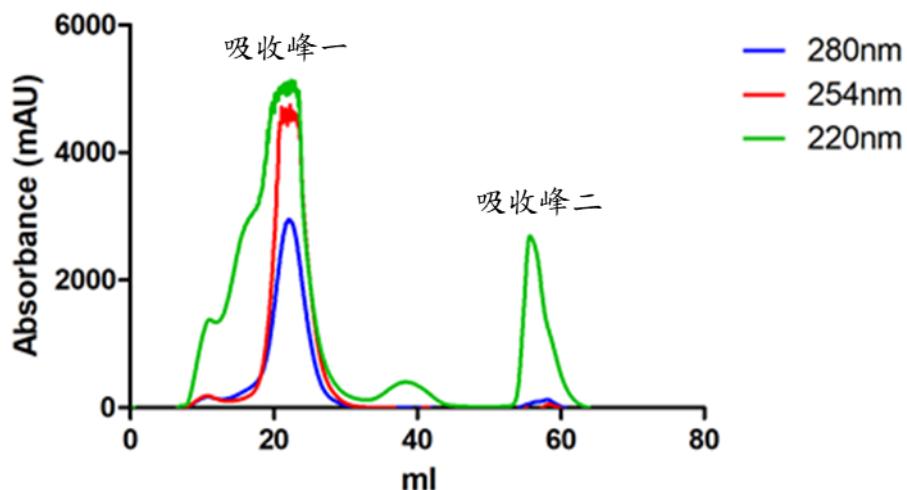


圖 3.17 p-tau 經 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 $UV_{280\text{nm}}$ 、紅線代表 $UV_{254\text{nm}}$ 、綠線代表 $UV_{215\text{nm}}$ 。以 FPLC buffer 和高鹽 buffer 沖提 100 ml，和純化 tau 的結果相似，吸收峰二為 p-tau。

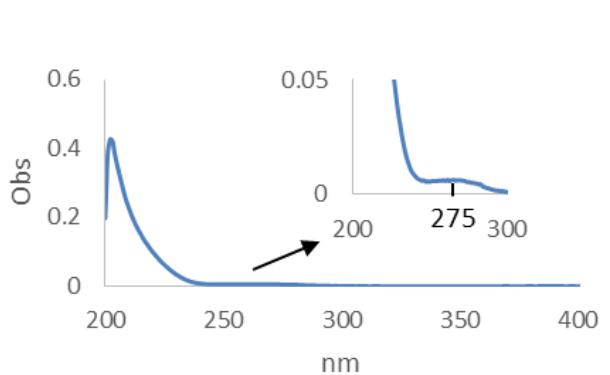


圖 3.18 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱純化後的 p-tau 進行全波長的吸光值測量圖。

縱軸為吸光值，橫軸為波長。原本很高的 UV_{257nm} 吸收峰消失了，只有 UV_{220nm} 有吸收峰，且 UV_{275nm} 有一點點吸收，此圖證明了樣品中含有沒受核酸污染的蛋白質。

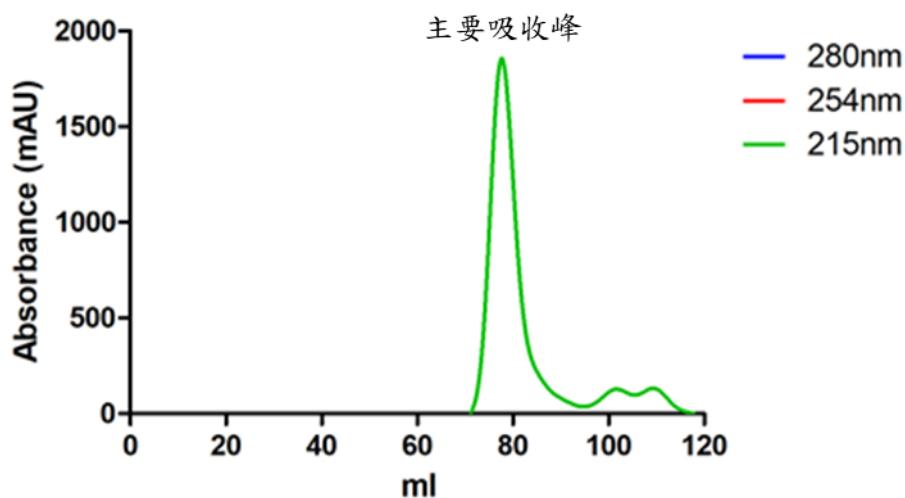


圖 3.19 去除 RNA 的 p-tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 UV_{280nm} 、紅線代表 UV_{254nm} 、綠線代表 UV_{215nm} 。以 FPLC buffer 沖提 120 ml，和 tau 的純化相似，主要的吸收峰為 p-tau。

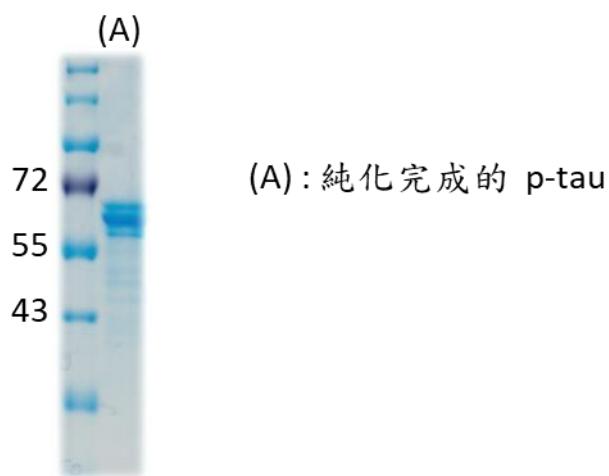


圖 3.20 純化完成的 p-tau 的 SDS-PAGE 圖。

以和純化 tau 相同的方法來純化 p-tau。

3.3 五種 tau 胜肽、一種有磷酸根的 tau 胜肽及兩種胜肽抑制物的製備

在胜肽合成的部分，我們使用固相合成儀來進行合成，合成出五種 tau 胜肽，分別為 Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂、Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂、tau244-280 (R1+PHF6*)、tau275-305 (PHF6*+R2) 和 tau281-311 (R2+PHF6) (圖 3.21)，一種帶有磷酸根的 tau 胜肽 (圖 3.22) 以及兩種胜肽抑制物分別為 R8-VQIINK 和 R8-VQIVYK (圖 3.23)。

1. Ac-**VQIINK**-NH₂
2. Ac-**VQIVYK**-NH₂
3. tau244-280 (R1+PHF6*) Ac-QTAPVPM^PDLKNVKS^KI^GSTENLKHQP^GGGK**VQIINK**-NH₂
4. tau275-305 (PHF6*+R2) Ac-**VQIINK**KLDLSNVQSKCGSKDN^IKHVP^GGGGS-NH₂
5. tau281-311 (R2+PHF6) Ac-KLDLSNVQSKCGSKDN^IKHVP^GGGGS**VQIVYK**-NH₂

圖 3.21 五種 tau 胜肽序列圖。



tau 244-280 w/ pSer262 Ac-QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-NH₂

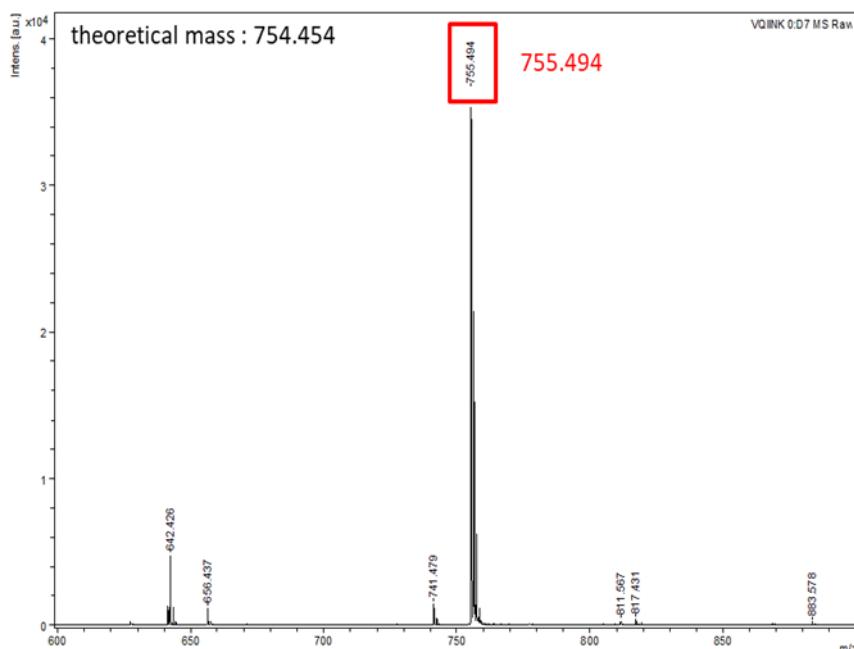
圖 3.22 帶有磷酸根的 tau 胜肽。

1. R8-VQIINK CRRRRRRRRVQIINK
2. R8-VQIVYK CRRRRRRRRVQIVYK

圖 3.23 兩種胜肽抑制物序列圖。

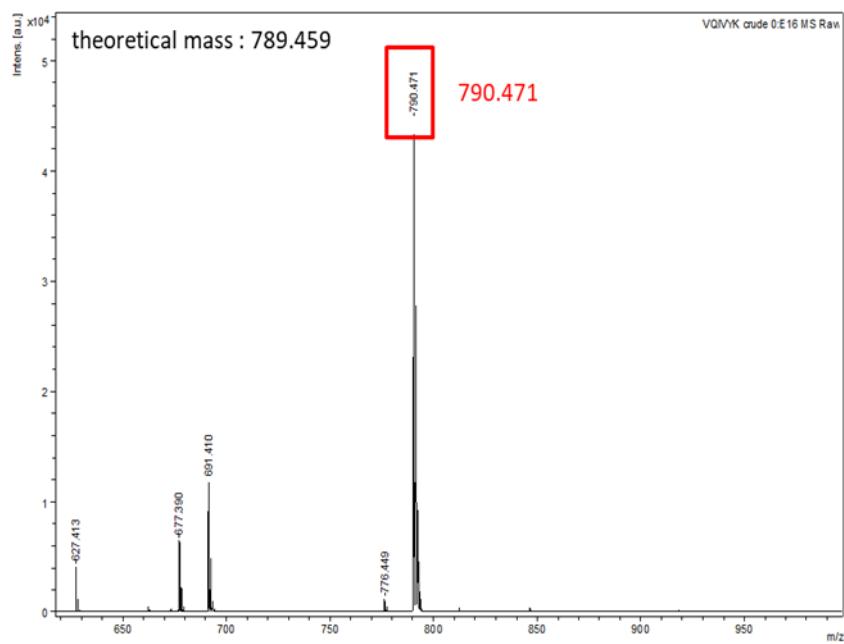
分別合成出上列八種胜肽之後，並從樹脂上切割下來，將未經純化的初產物送至分生所質譜室進行分子量的鑑定，並比較胜肽的實際分子量值和理論分子量質 (theoretical mass) 來判斷合成是否成功，但因使用基質輔助雷射脫附游離質譜分析時，基質 (matrix) 會釋放帶電質子 (proton, H⁺) 並結合到樣品上，使樣品帶有電荷以幫助質譜測量，但會導致樣品的分子量會有 1 至 2 的誤差。由結果可以看出合成出的樣品中均含有目標產物 (圖 3.24)。

(A) Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂

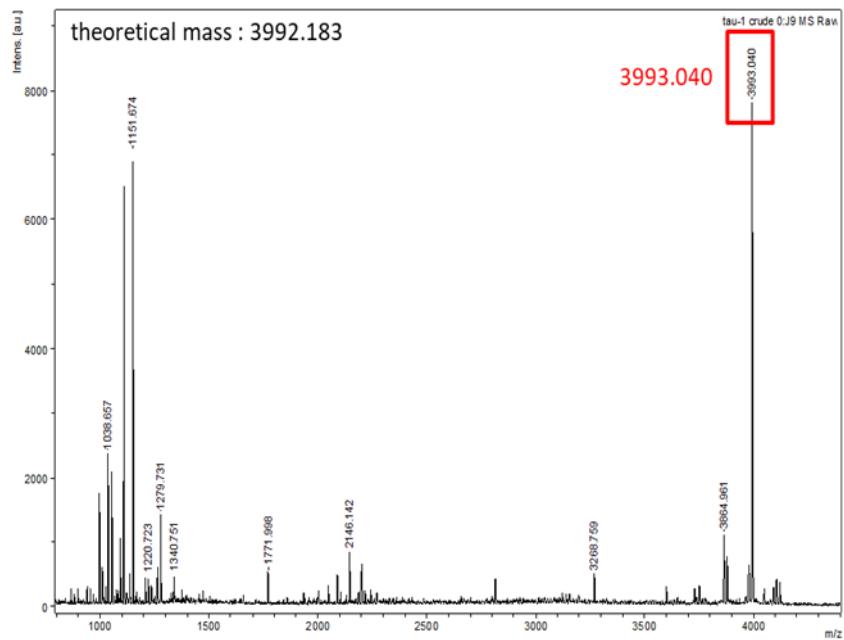




(B) Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂

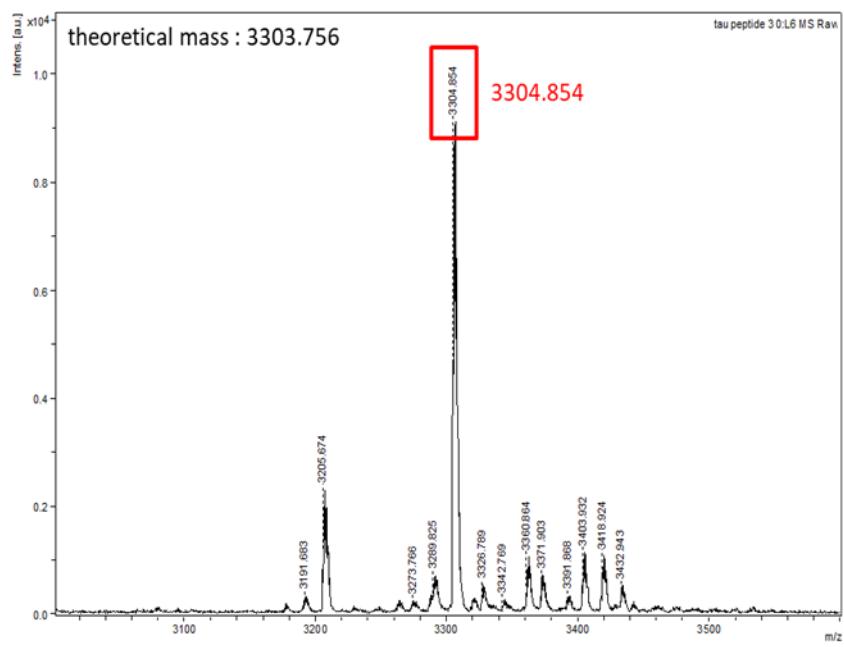


(C) tau244-280 (R1+PHF6*)

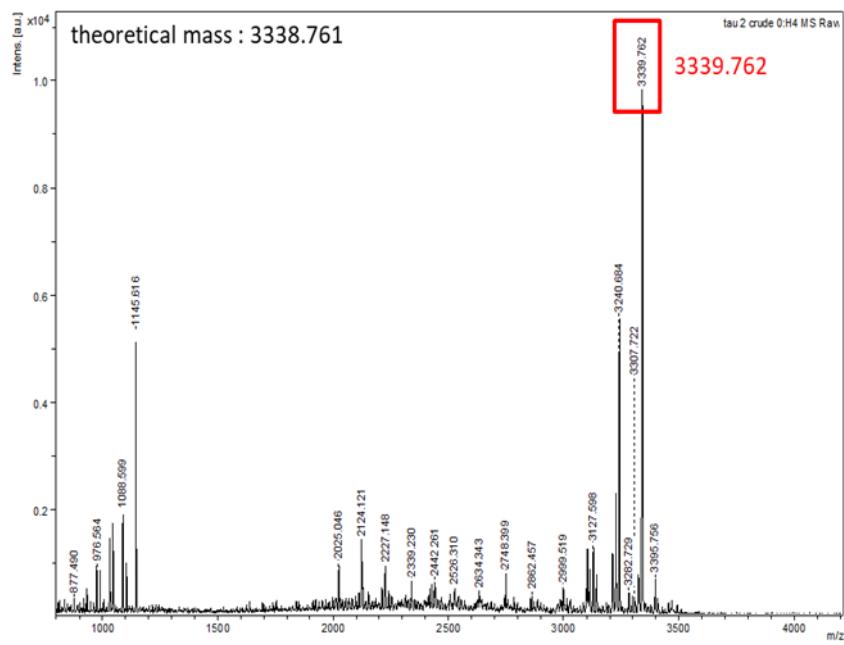




(D) tau275-305 (PHF6*+R2)

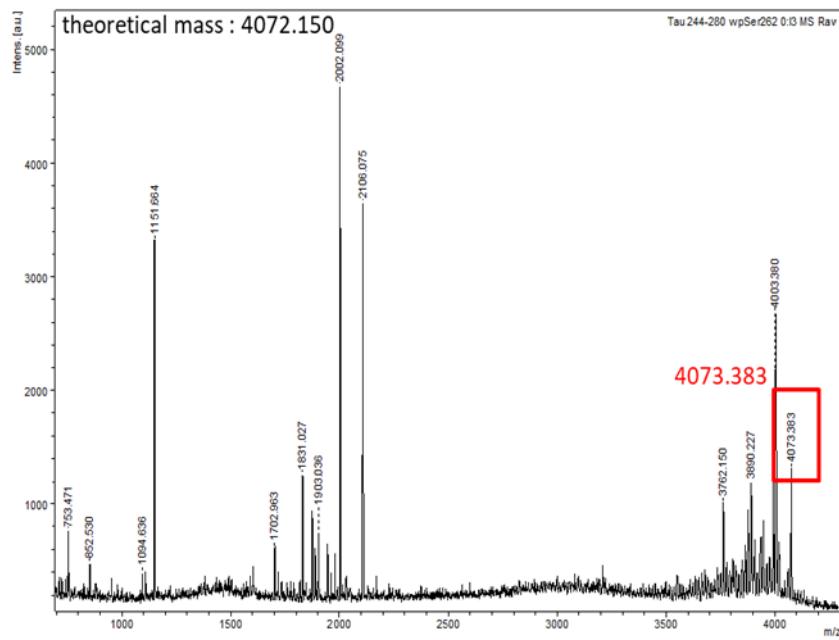


(E) tau281-311 (R2+PHF6)

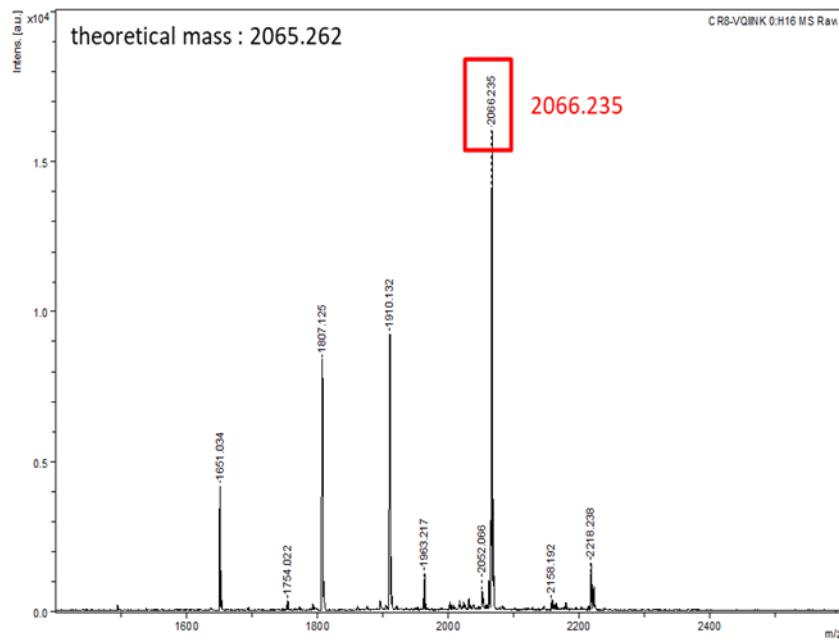




(F) tau244-280 w/ pSer262



(G) R8-VQIINK





(H) R8-VQIVYK

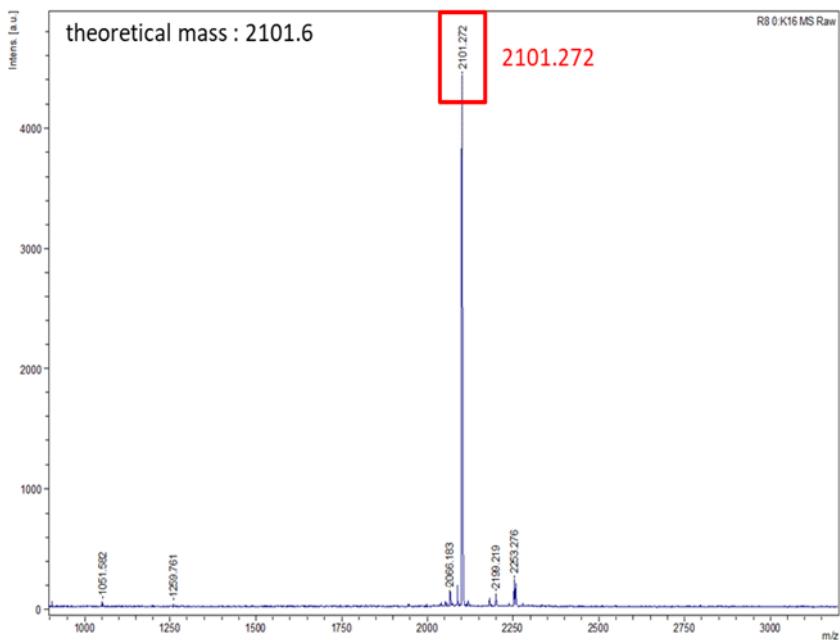


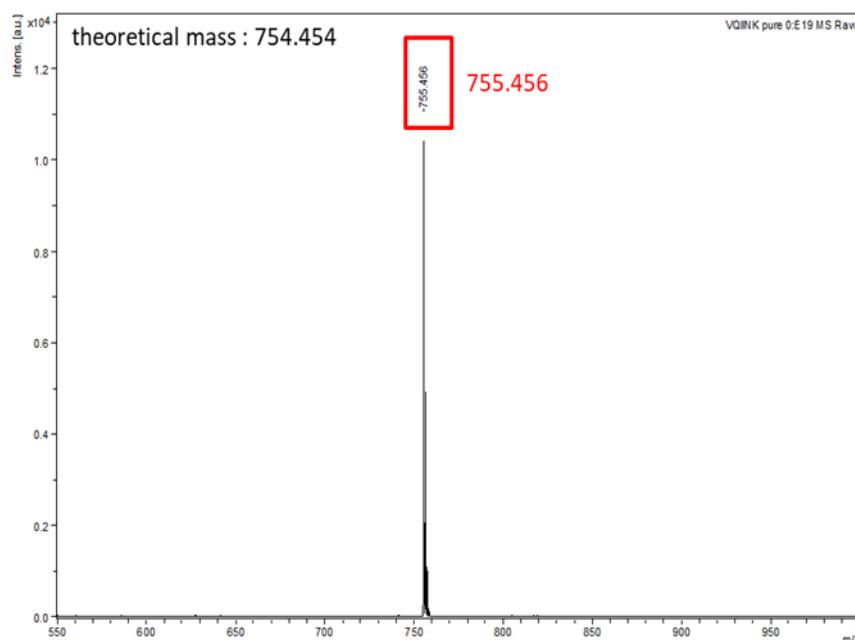
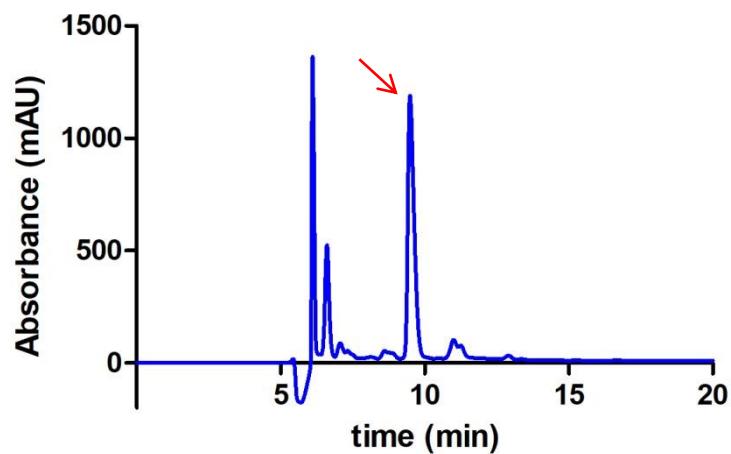
圖 3.24 八種勝肽初產物的質譜圖。

紅色數字為主產物的分子量；各勝肽的理論分子量標記在質譜圖左上方。(A) Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂，分子量為 755.494 Da。(B) Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂，分子量為 790.471 Da。(C) tau244-280 (R1+PHF6*)，分子量為 3993.040 Da。(D) tau275-305 (PHF6*+R2)，分子量為 3304.854 Da。(E) tau281-311 (R2+PHF6)，分子量為 3339.762 Da。(F) tau244-280 w/ pSer262，分子量為 4073.383 Da。(G) R8-VQIINK，分子量為 2066.235 Da。(H) R8-VQIVYK，分子量為 2101.272 Da。

緊接著將合成完的初產物溶於水中，其中 tau244-280 (R1+PHF6*) 和 tau244-280 w/ pSer262 先用 3K 濃縮離心管將分子量較小的其他勝肽去除，再將這八種勝肽透過 C18 管柱來純化，利用勝肽親疏水性的不同的特性將目標勝肽和其他產物分開，八種勝肽有各自的純化條件，收下 HPLC 純化圖中主要的吸收峰，再進行一次質譜分析來確認是否成功純化出目標產物（圖 3.25）。

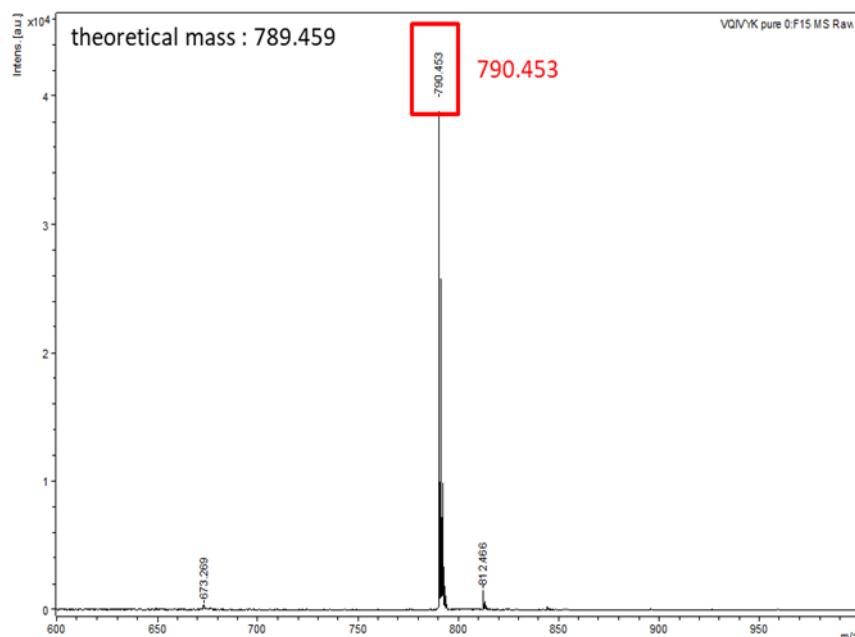
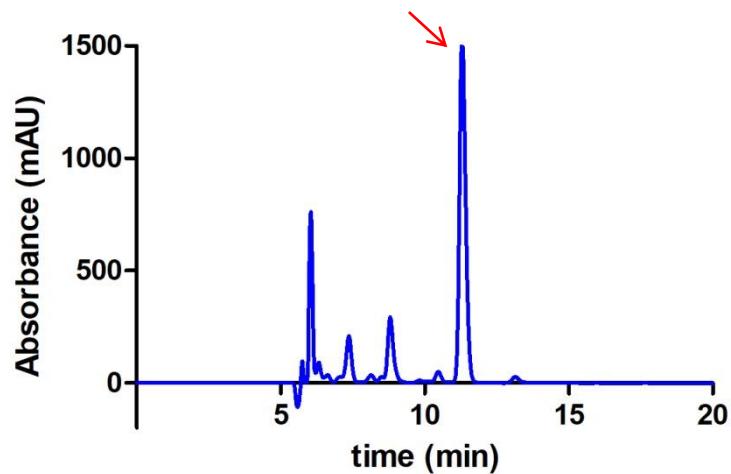


(A) Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂

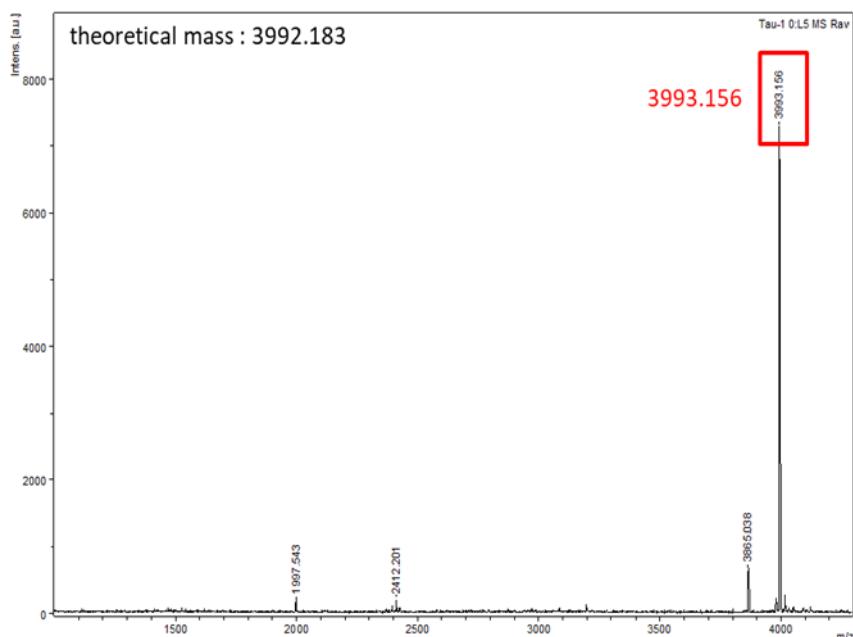
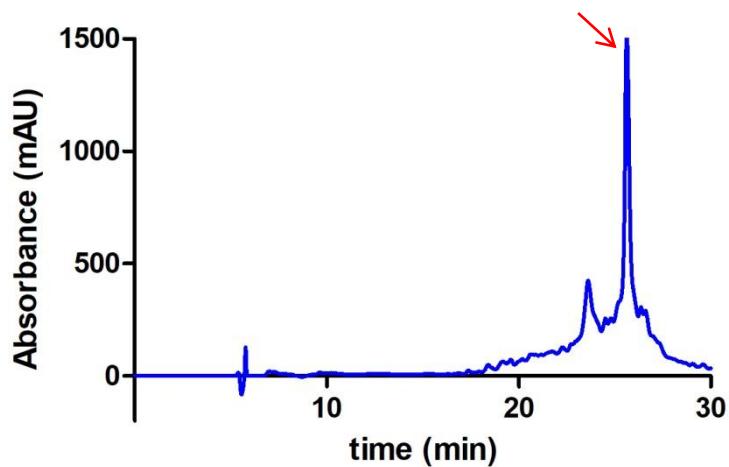




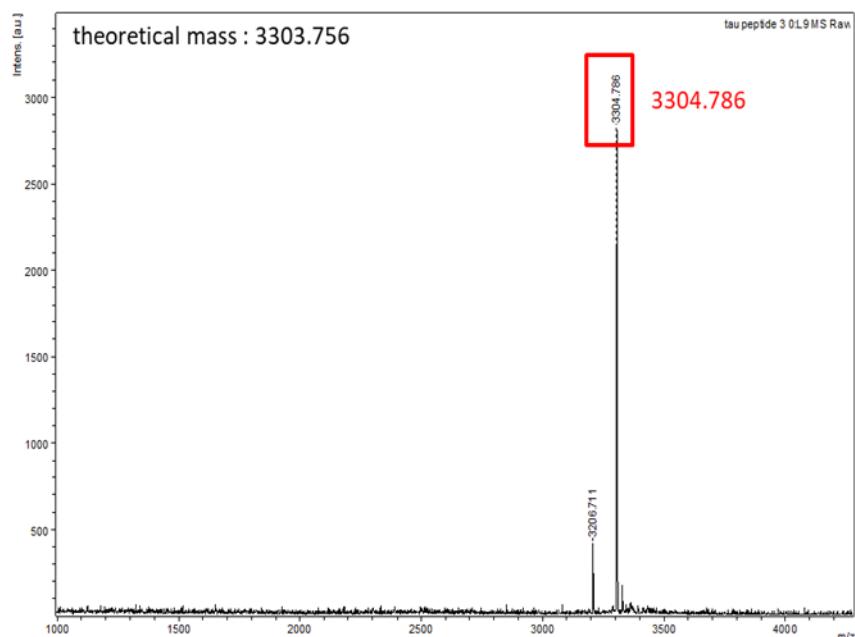
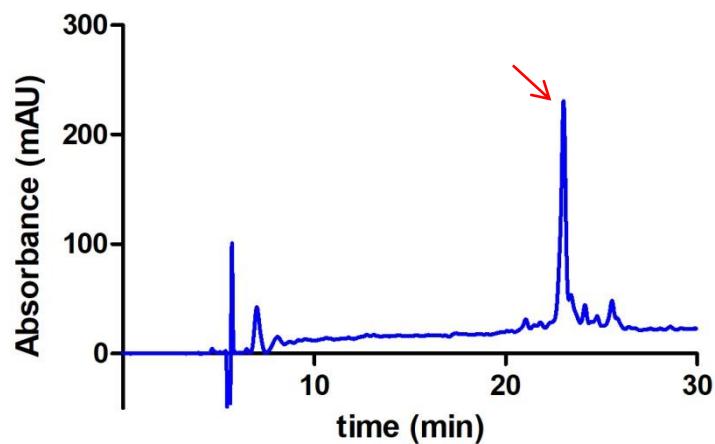
(B) Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂



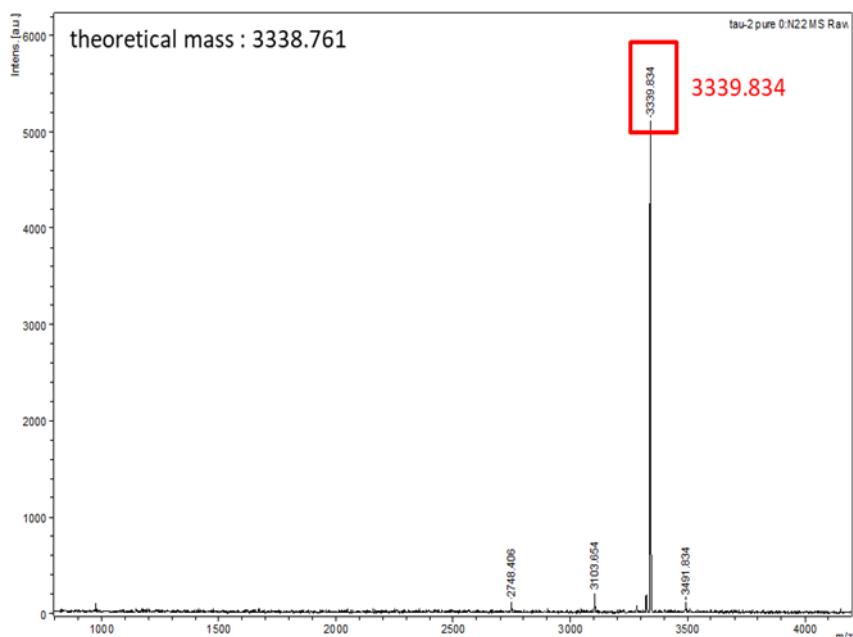
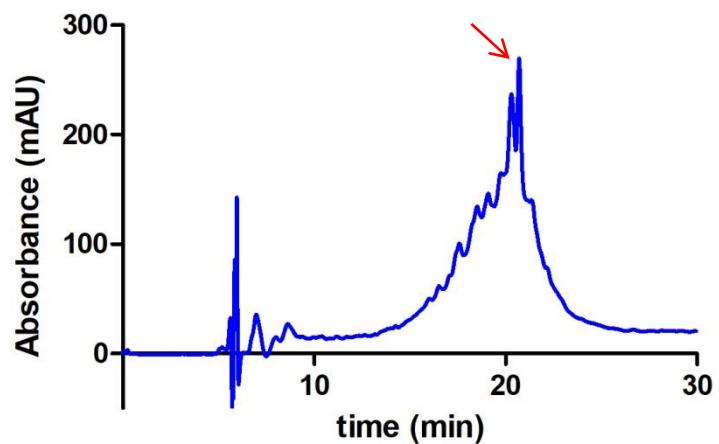
(C) tau244-280 (R1+PHF6*)



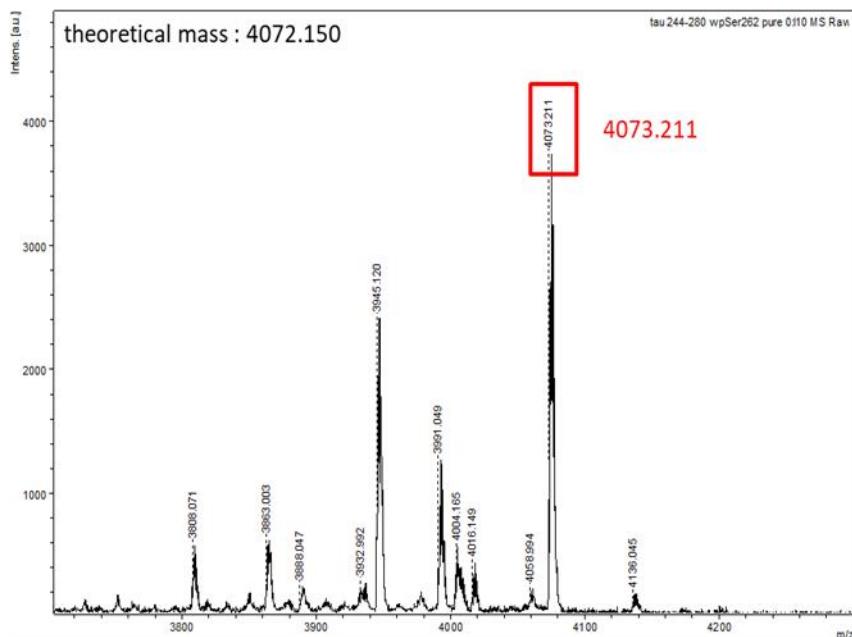
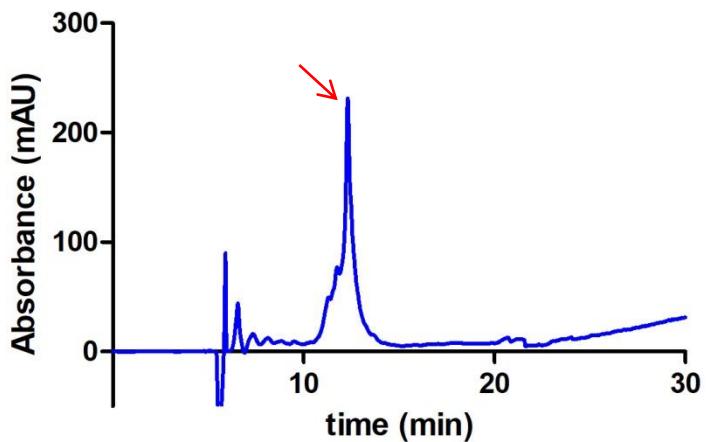
(D) tau275-305 (PHF6*+R2)



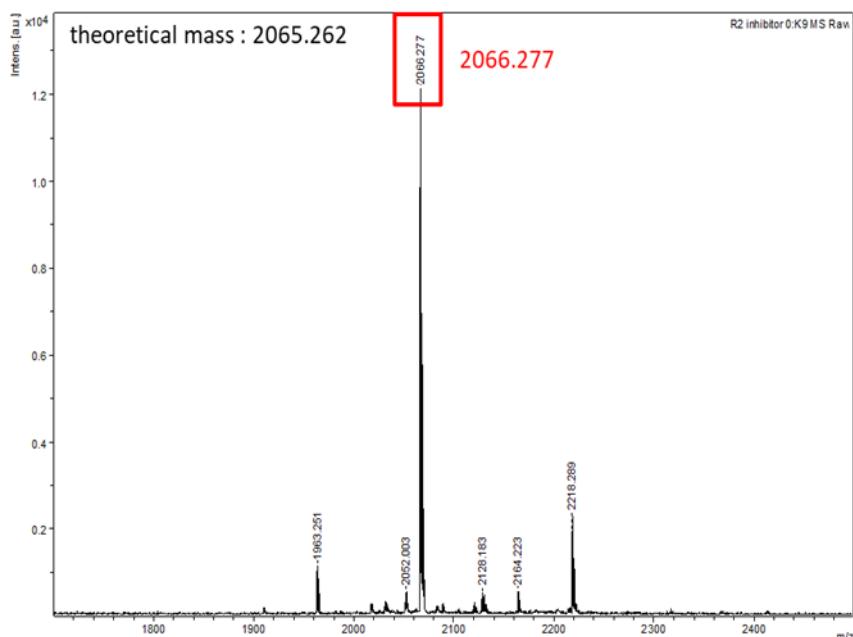
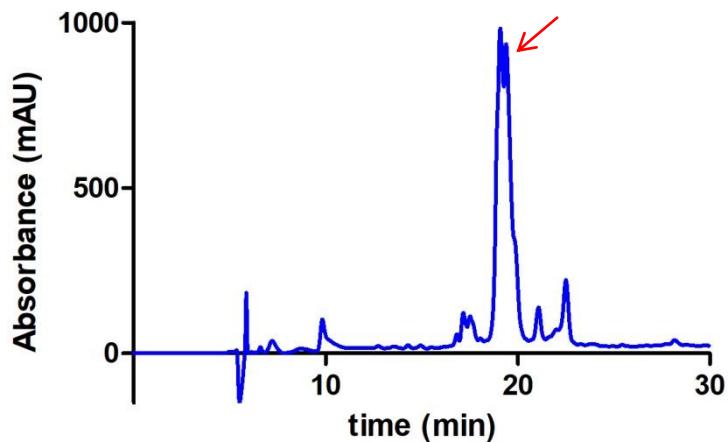
(E) tau281-311 (R2+PHF6)



(F) tau244-280 w/ pSer262



(G) R8-VQIINK





(H) R8-VQIVYK

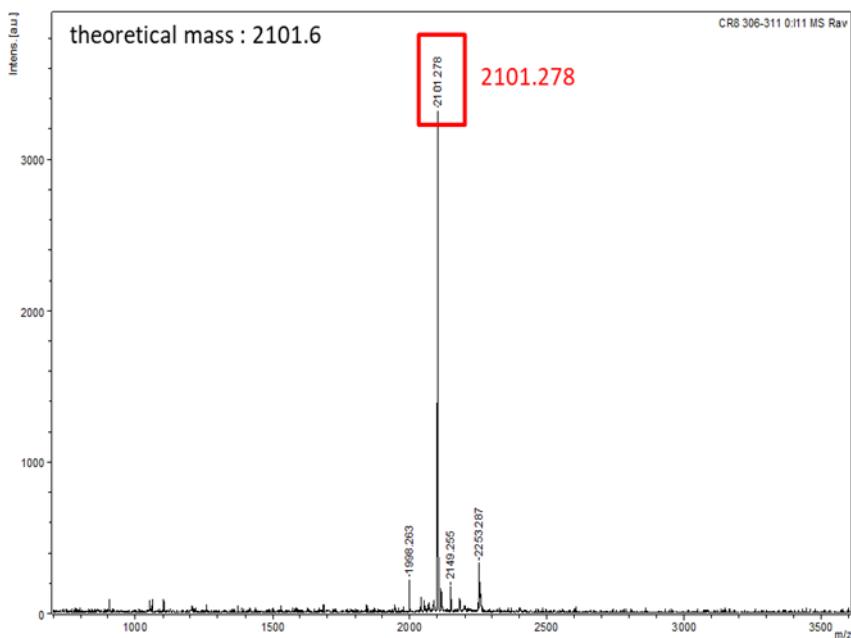
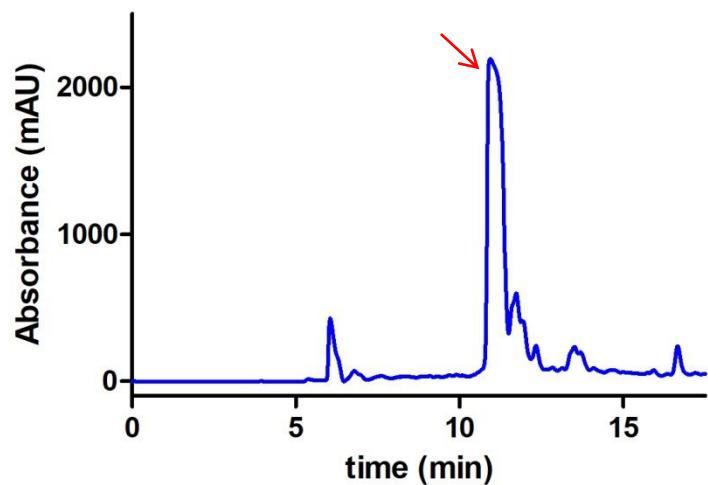


圖 3.25 八種胜肽的 HPLC 純化圖及純化後的質譜圖。

每一項的上圖為 HPLC 純化圖，縱軸為吸光值，橫軸為時間，藍線代表 UV_{220nm} ，紅色箭頭指的吸收峰即是目標產物；下圖為質譜圖。(A) $Ac\text{-}^{275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$ ，以 15-30% buffer B 沖提 20 分鐘。(B) $Ac\text{-}^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ ，以 15-30% buffer B 沖提 20 分鐘。(C) tau244-280 (R1+PHF6*)，以 0-30% buffer B 沖提 30 分鐘。(D) tau275-305 (PHF6*+R2)，以 0-40% buffer B 沖提 30 分鐘。(E) tau281-311

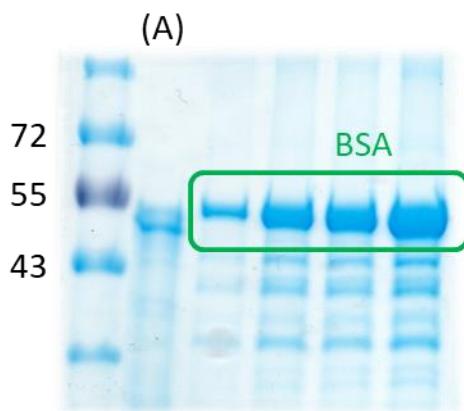


(R2+PHF6)，以 0-40% buffer B 沖提 30 分鐘。(F) tau244-280 w/ pSer262，以 0-100% buffer B 沖提 30 分鐘。(G) R8-VQIINK，以 0-30% buffer B 沖提 30 分鐘。(H) R8-VQIVYK，以 0-100% buffer B 沖提 30 分鐘，但在 17.5 分鐘時就中斷沖提，因樣品已經被沖提出來了。

3.4 Aggregation test

3.4.1 p-tau

首先我們先使用 p-tau 進行 aggregation test，將純化後的 p-tau 先利用 BSA 進行定量（圖 3.26），再使用 ImageJ 和 Excel 軟體進行迴歸分析，即可得知 p-tau 的濃度，接著將 aggregation buffer、ThS 和 p-tau 均勻混合，調配成濃度為 6 / 10 / 15 μM p-tau 和 20 μM ThS，在對 p-tau 進行測試之前，我們先製備了只含有 aggregation buffer 和 ThS 的控制組（control）進行測量，結果螢光訊號並沒有上升（圖 3.27），接著培養 p-tau 來觀察是否有螢光訊號的上升（圖 3.28），從結果來看螢光訊號沒有變化，我們認為或許是改變了純化的方法而導致 p-tau 無法自發性地形成澱粉樣纖維，郭敏豪老師建議我們照最原始的方法純化，即是依序使用破菌、煮沸、TEV protease 處理、通過管柱的順序來進行純化，不要使用冷凍破菌法、直接煮沸法以及可以去除 RNA 的 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱，所以我們重新純化了 p-tau，破菌完後煮沸樣品，並加入 TEV protease 反應，再利用 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化（圖 3.29），收集 42-66 ml 處的樣品，並由 SDS-PAGE 觀察哪些收下來的收集管含有 p-tau（圖 3.30），將 p-tau 收集起來並濃縮，最後加入 glycerol 即完成純化，並再次進行 SDS-PAGE 確認純化的步驟是否正確並同時用 BSA 定量（圖 3.31）。



(A) : 純化完成的 p-tau

圖 3.26 p-tau 的 BSA 定量。

膠片上為 (A) 純化後的 p-tau，綠色框線為濃度 $0.2 / 0.4 / 0.6 / 0.8 \text{ mg/ml}$ 的 BSA。

依 BSA 來為 p-tau 進行定量，以此次為例則得到 $8.26 \mu\text{M}$ 而量為 1 ml 的 p-tau。。

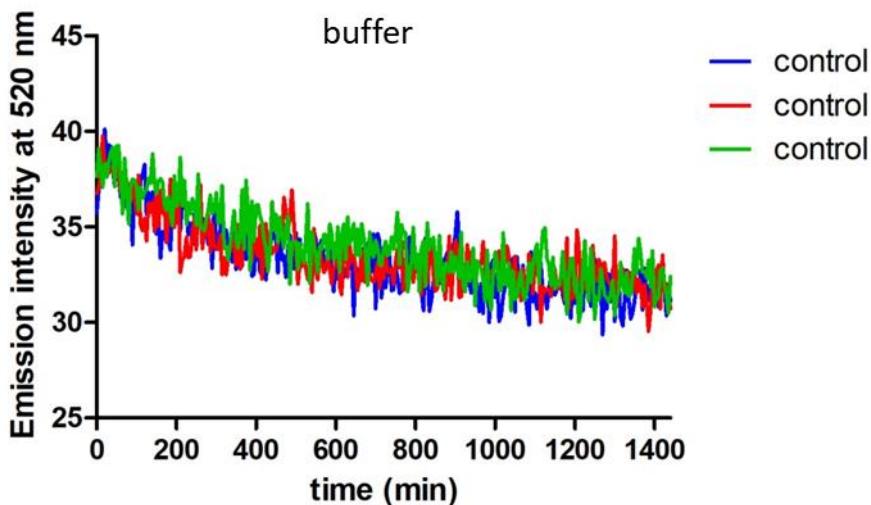


圖 3.27 利用微量盤螢光分光光譜儀測的只含有 buffer 和 ThS 而不含蛋白質樣品的控制組。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表三重複，培養 24 小時。

經過 24 小時，螢光訊號沒有增加。

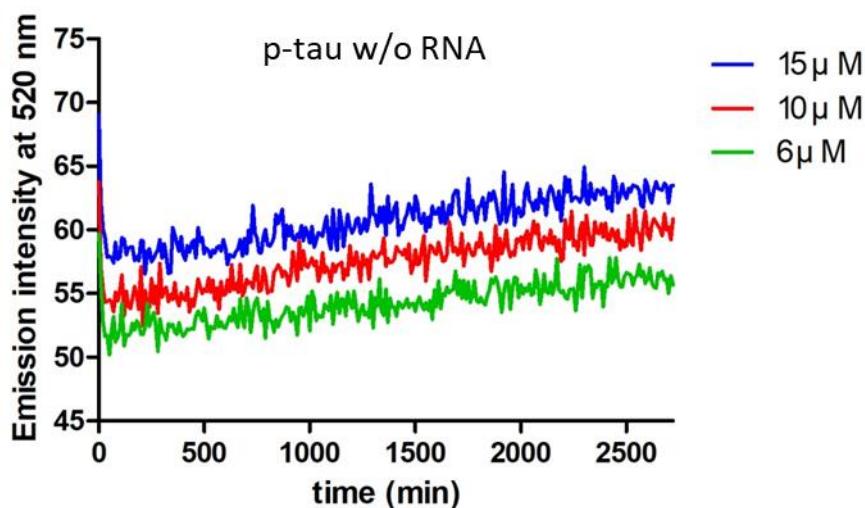


圖 3.28 利用微量盤螢光分光光譜儀測的不含 RNA 的 p-tau aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線代表 $15 \mu\text{M}$ w/o p-tau、紅線代表 $10 \mu\text{M}$ p-tau w/o RNA、綠線代表 $6 \mu\text{M}$ p-tau w/o RNA，培養 48 小時。經過 48 小時，螢光訊號並沒有明顯增加，而且起始的訊號還先下降，和其他研究的螢光訊號曲線不同，推測沒有 p-tau 纖維的形成。

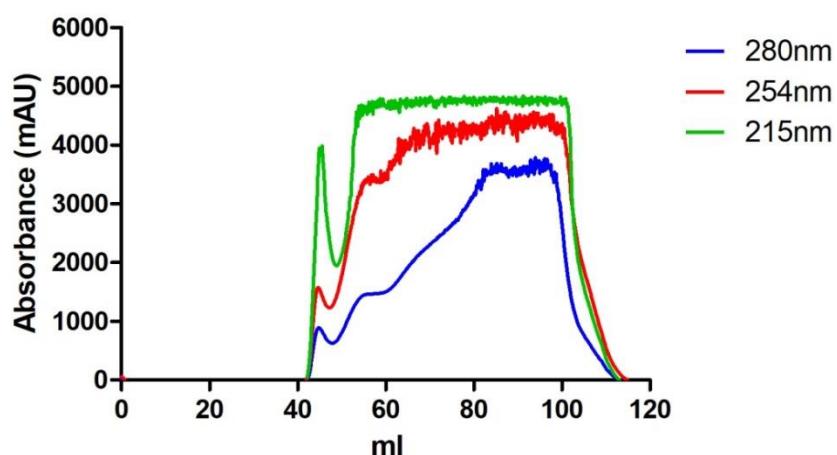


圖 3.29 p-tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 $\text{UV}_{280\text{nm}}$ 、紅線代表 $\text{UV}_{254\text{nm}}$ 、綠線代表 $\text{UV}_{215\text{nm}}$ 。以 FPLC buffer 沖提 120 ml，收集 42-66 ml 處的樣品。

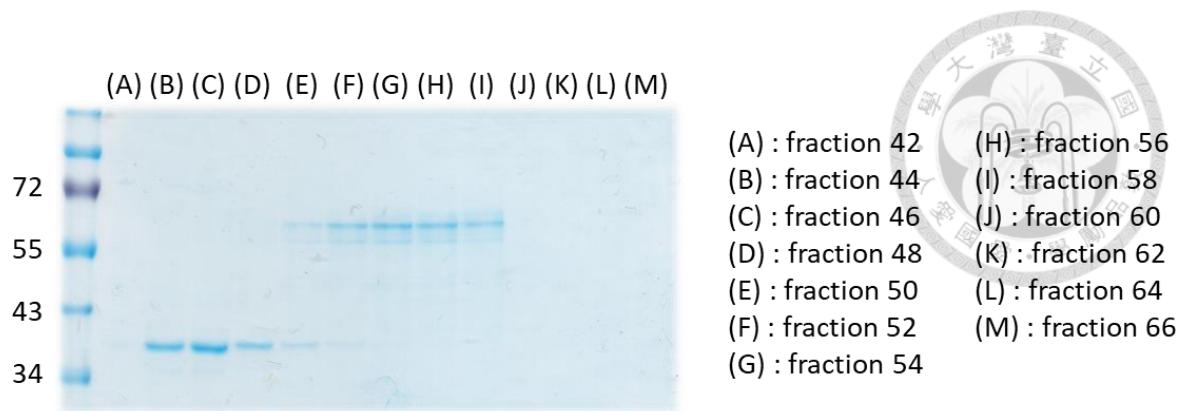


圖 3.30 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A)-(M) 分別為 fraction 42-66。可以看到 p-tau 位於 fraction 52-58 之中。

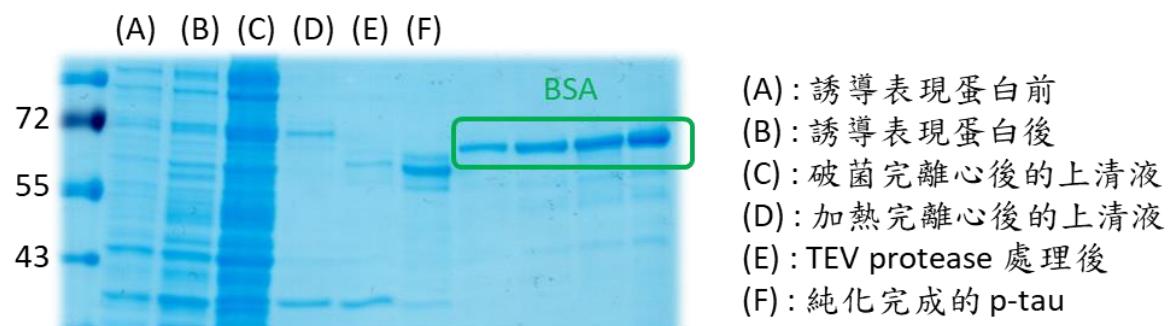


圖 3.31 純化 p-tau 的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A) 誘導表現蛋白前、(B) 誘導表現蛋白後、(C) 破菌完離心後的上清液、(D) 加熱完離心後的上清液、(E) TEV protease 處理後、(F) 純化完成的 p-tau，綠色框線為濃度 0.2 / 0.4 / 0.6 / 0.8 mg/ml 的 BSA。經純化後可以得到純的 p-tau，依 BSA 來為 p-tau 進行定量，以此次為例則得到 11 μM 而量為 600 μl 的 p-tau。



隨即我們將依照原始方法進行純化的 p-tau 和 ThS 混合進行 aggregation test，結果螢光確實有上升，推測 p-tau 確實有成功形成澱粉樣纖維（圖 3.32），接著我們將 p-tau 纖維點到 grid 上，經負染色後利用 TEM 取像，以此證明 p-tau 有形成澱粉樣纖維，由 TEM 圖像可以找到許多絲線狀的纖維（圖 3.33），證明了 p-tau 確實可以自發性地形成澱粉樣纖維，因此我們推測 RNA 可以協助 p-tau 形成纖維。

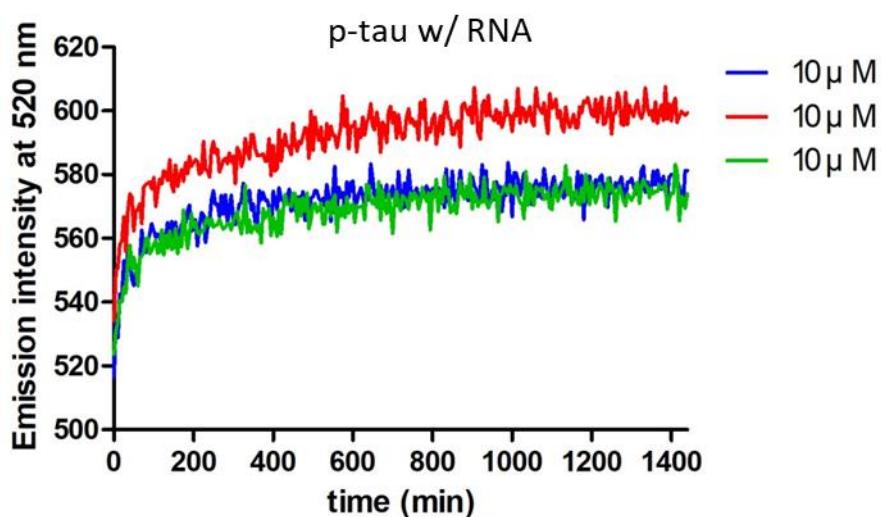


圖 3.32 利用微量盤螢光分光光譜儀測的含 RNA 的 p-tau aggregation test。縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表 $10 \mu\text{M}$ p-tau w/ RNA 三重複，培養 24 小時。經過 24 小時，螢光訊號有增加，和其他研究的螢光訊號曲線相似，推測有 p-tau 纖維的形成。

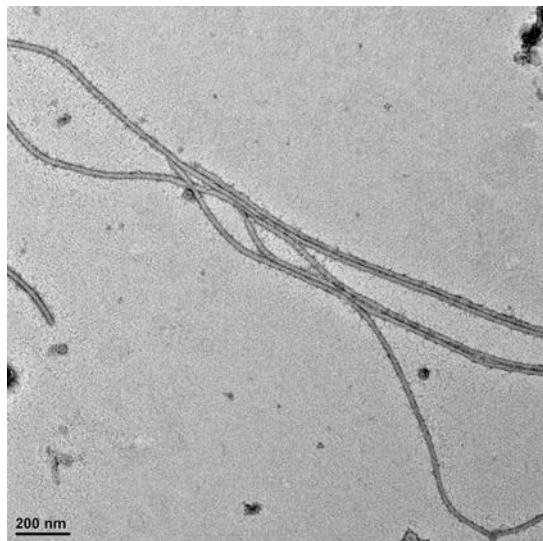


圖 3.33 p-tau fibril 的 TEM 照片。

使用 TEM 觀察到的 p-tau 纖維，放大倍率為 9900X，比例尺為 200 nm。

之後我們將 p-tau 樣品進行液相層析-串聯式質譜分析，看樣品中哪些胺基酸有被磷酸化修飾（圖 3.34），結果只有看到一個位置有被進行磷酸化作用，在 Thr231 的位置，我們推測 p-tau 在其他位置也是有被磷酸化的，但是在質譜分析時，這些具有磷酸化修飾的勝肽片段和沒有被修飾的相同勝肽片段比起來訊號較低，導致分析軟體在進行判讀時會認為該段勝肽並沒有被修飾。



(A)

microtubule-associated tau protein [Homo sapiens]

Database: NCBIprot

Score: 3407

Monoisotopic mass (M_r): 43039

Calculated pI: 8.97

Taxonomy: Homo sapiens

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of AAU45390.1 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: D:\Orbitrap Elite Data\190705\P-tau_190705.mgf

Enzyme: Lys-C+Trypsin, a mixture of enzymes, which cuts

- C-term side of K;
- C-term side of R unless next residue is P.

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (D), Phospho (H), Phospho (ST), Phospho (Y).

Protein sequence coverage: 69%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGETTD AGLKESPPQT
51 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS
101 KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP
151 KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREPKKVAVV
201 RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ PGGGVQIIN
251 KKLIDLNVQS KCGSKDNIHK VPGGGSVQIV YKPVDSLKVT SKCGSLGNIH
301 HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
351 ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA
401 DEVSASLAKQ GL

```

(B)

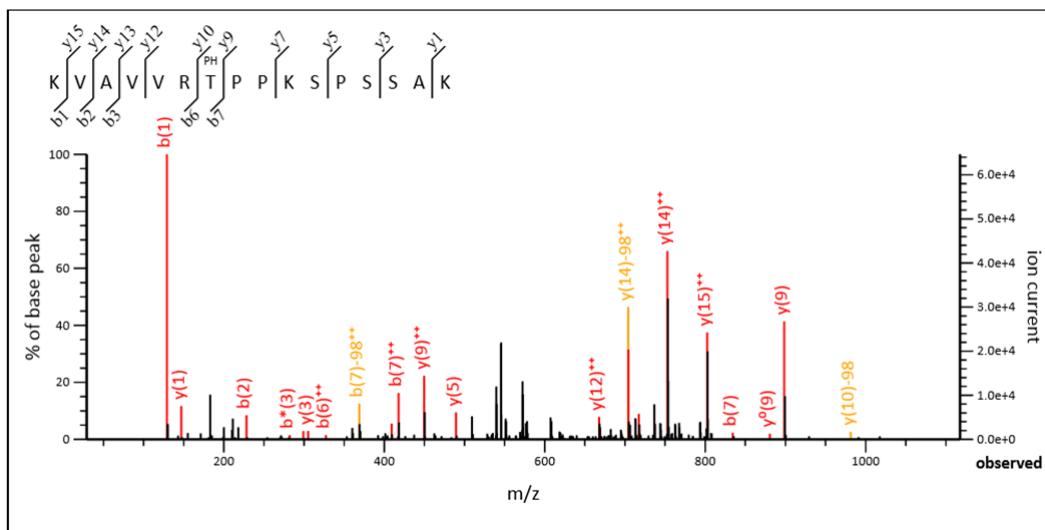


圖 3.34 p-tau 的液相層析-串聯式質譜分析。

(A) 序列比對圖，紅色的字體為被機器偵測到的序列。(B) 部分質譜分析圖。由質譜分析的結果可以看到樣品中確實含有 tau，且在 Thr231 有被磷酸化。



在測試中我們使用的螢光染劑為 ThS 而不是 ThT，我們曾經使用 ThT 來進行測試，結果初始的螢光訊號就非常高，而且隨著時間的增加反而螢光訊號會降低（圖 3.35），我們懷疑 ThT 是否和 RNA 有作用，因此使用螢光光譜儀進行測試，將 ThT 和由其他實驗室借來的 RNA 進行混合並測量螢光，結果有螢光訊號，代表 ThT 會和 RNA 進行反應，同時我們也另外做了一組 ThT 加 RNA 以及普立昂纖維 (prion fibril) 的組別（圖 3.36），結果螢光訊號和沒有含普立昂纖維的組別比起稍微降低了一點點，所以我們推測 RNA 和纖維之間可能會競爭和 ThT 的結合位置，因此在含 RNA 的樣品皆使用 ThS 當螢光染劑，為了保持統一性，p-tau 和 tau 的實驗皆使用 ThS，而後續的勝肽測試因不含 RNA，所以勝肽實驗皆用 ThT。

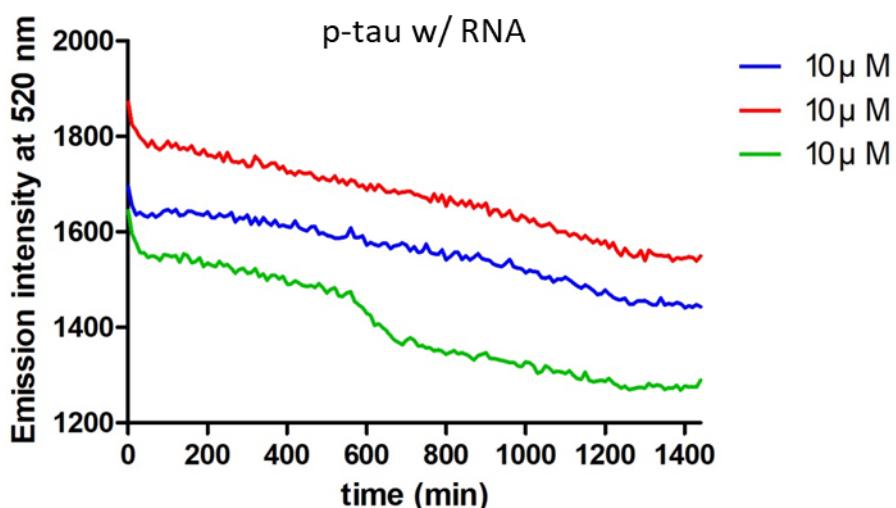


圖 3.35 使用 ThT 的 p-tau aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表 $10 \mu\text{M}$ p-tau w/ RNA 三重複，培養 24 小時。

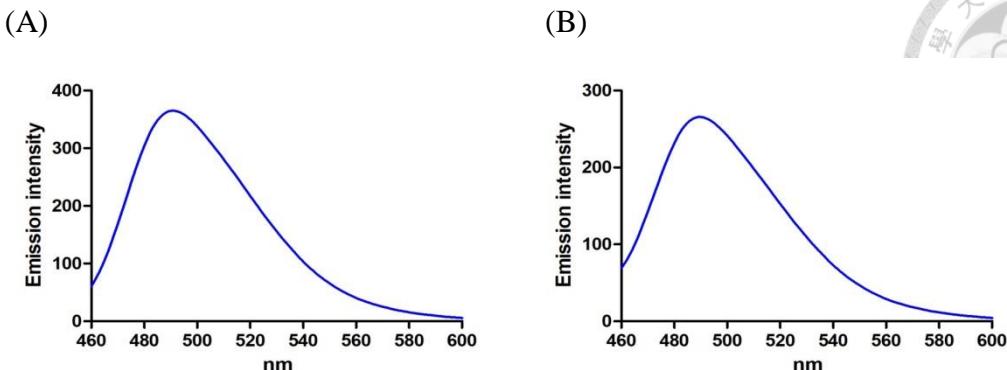


圖 3.36 使用螢光光譜儀測量 ThT 加 RNA 和普立昂纖維的螢光訊號。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長。(A) ThT + RNA 的螢光訊號。(B) ThT + RNA + 普立昂纖維的螢光訊號。由圖可以看到 ThT 會和 RNA 有反應而發出螢光，但加入普立昂纖維後訊號稍微降低了一點點。

3.4.2 tau

有了 p-tau 的經驗，我們隨即將 tau 依照原始的純化方法來重新純化，即是依序使用破菌、煮沸、TEV protease 處理、通過管柱的順序來進行純化，破菌完後煮沸樣品，並加入 TEV protease 反應，再利用 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化(圖 3.37)，收集 45-66 ml，並由 SDS-PAGE 觀察哪些收下來的收集管含有 tau(圖 3.38)，將 tau 收集起來並濃縮，最後加入 glycerol 即完成純化，並再次進行 SDS-PAGE 確認純化的步驟是否正確並同時用 BSA 定量(圖 3.39)，由結果來看經純化後的樣品確實含有 tau，而且降解的產物比之前來的少，推測是純化的手法比較熟練且純化的時間較之前來的短。

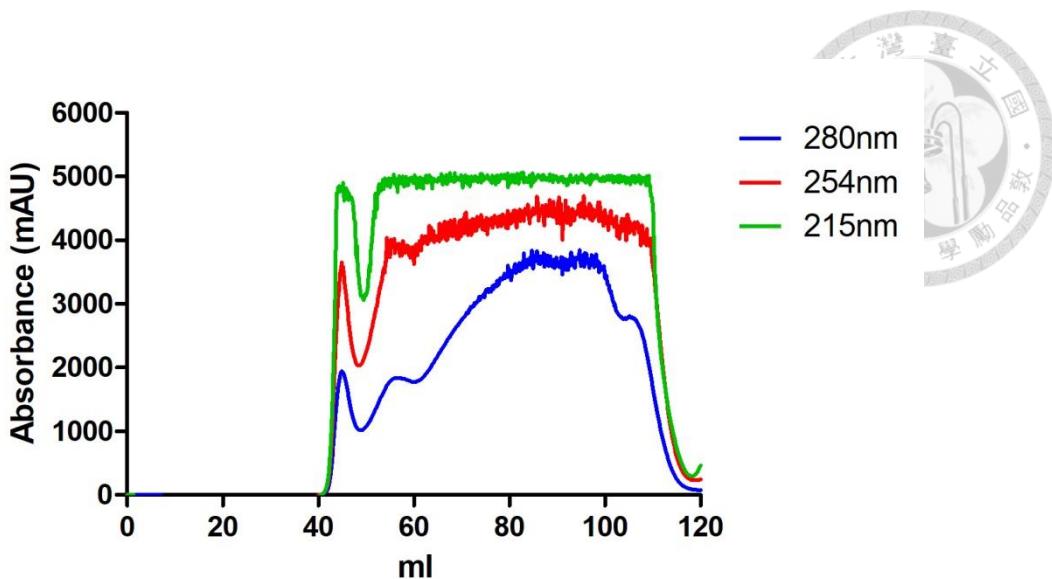


圖 3.37 tau 經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化結果圖。

縱軸為吸光值，橫軸為毫升，藍線代表 UV_{280nm} 、紅線代表 UV_{254nm} 、綠線代表 UV_{215nm} 。以 FPLC buffer 沖提 120 ml，收集 45-66 ml 處的樣品。

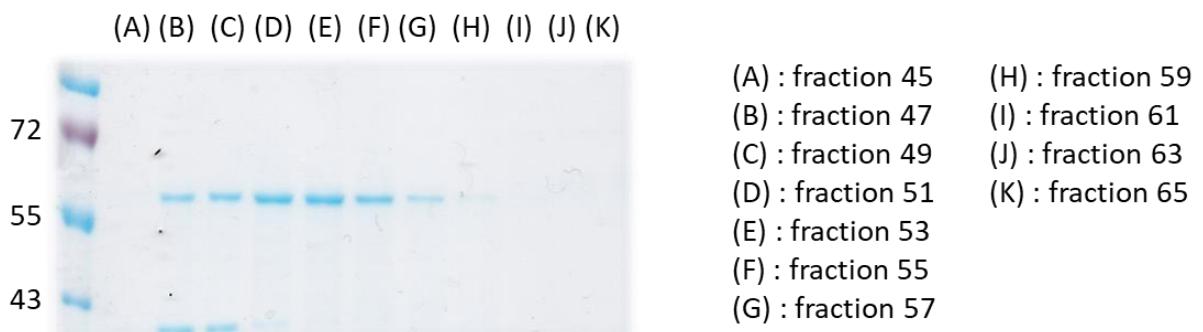


圖 3.38 收集下來的樣品 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A)-(K) 分別為 fraction 45-65。可以看到 tau 位於 fraction 51-59 之中。

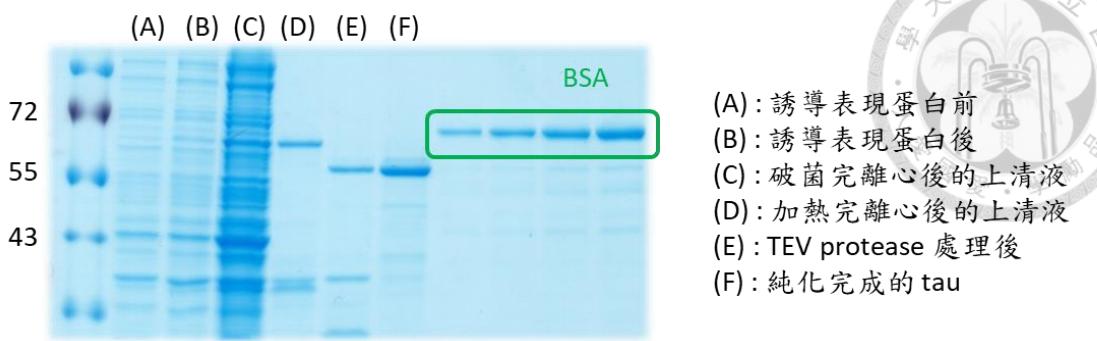


圖 3.39 純化 tau 的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A) 誘導表現蛋白前、(B) 誘導表現蛋白後、(C) 破菌完離心後的上清液、(D) 加熱完離心後的上清液、(E) TEV protease 處理後、(F) 純化完成的 tau，綠色框線為濃度 $0.2 / 0.4 / 0.6 / 0.8 \text{ mg/ml}$ 的 BSA。經純化後可以得到純的 tau，依 BSA 來為 tau 進行定量，以此次為例則得到 $18.3 \mu\text{M}$ 而量為 $778 \mu\text{l}$ 的 tau。

純化並定量好 tau 之後，將 aggregation buffer、ThS 和 tau 均勻混合，因為樣品不夠的緣故而無法用 $10 \mu\text{M}$ tau，故調配成濃度為 $9 \mu\text{M}$ tau 和 $20 \mu\text{M}$ ThS 的組別，同時準備另一組樣品含有 $9 \mu\text{M}$ tau、 $2.25 \mu\text{M}$ heparin 和 $20 \mu\text{M}$ ThS，因為 tau 要形成澱粉樣纖維必須有 heparin 的幫助，在測量之前，我們同樣先使用只含有 aggregation buffer、heparin 和 ThS 的控制組進行測試，結果螢光訊號沒有上升（圖 3.40），接著比較 tau 兩組來觀察是否在 aggregation test 有不一樣的結果（圖 3.41），由結果來看沒有加 heparin 的組別增加的螢光訊號反而比有加 heparin 的組別高一點，但增加的幅度不大，很難判定有無形成纖維。

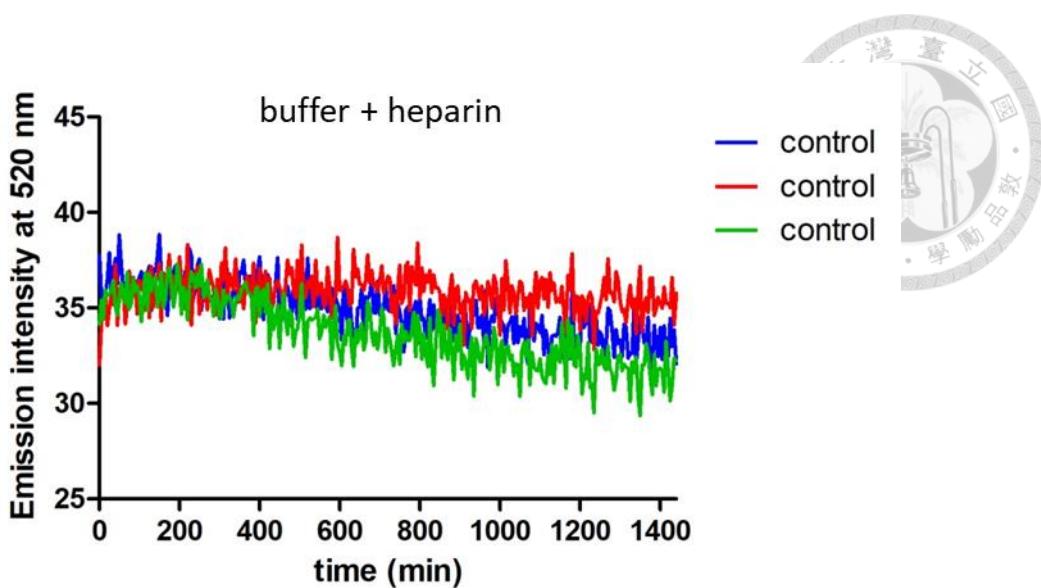
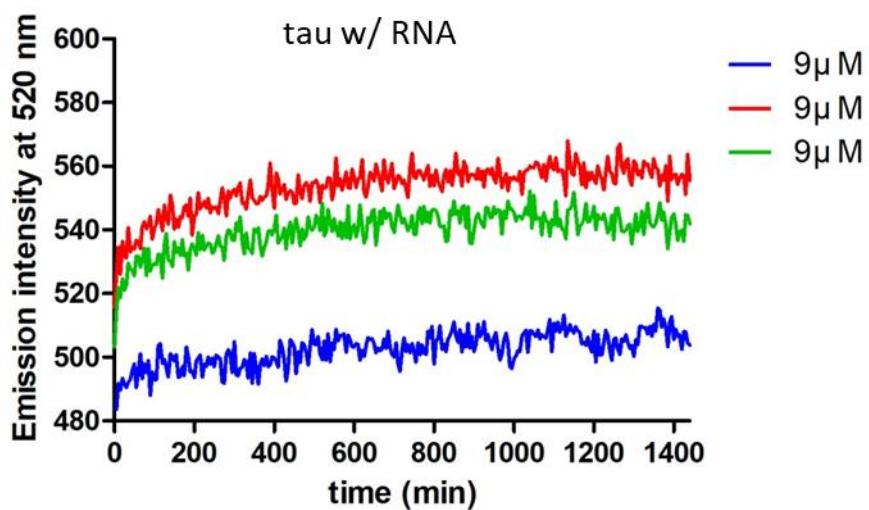


圖 3.40 利用微量盤螢光分光光譜儀測的只含有 buffer、heparin 和 ThS 而不含蛋白質樣品的控制組。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表三重複，培養 24 小時。經過 24 小時，螢光訊號沒有增加。

(A) tau w/ RNA





(B) tau w/ RNA + heparin

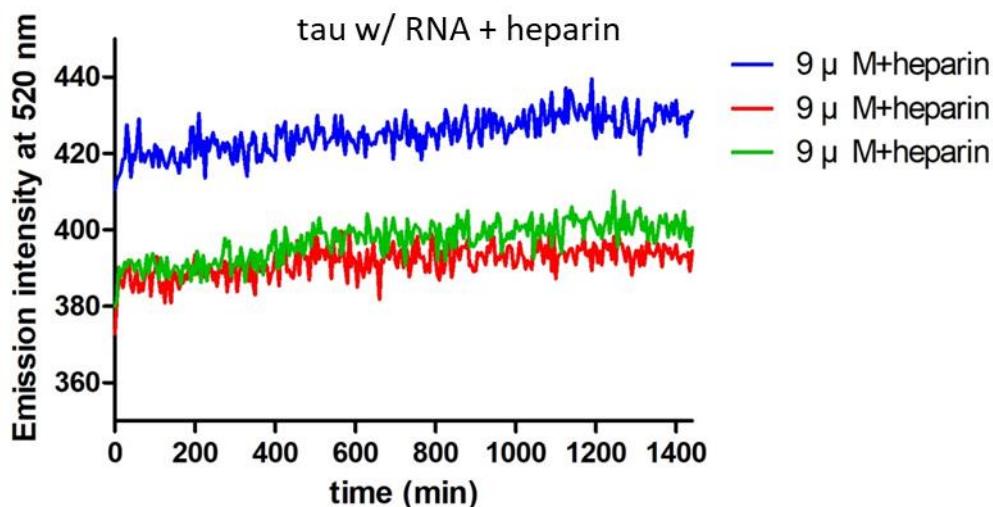


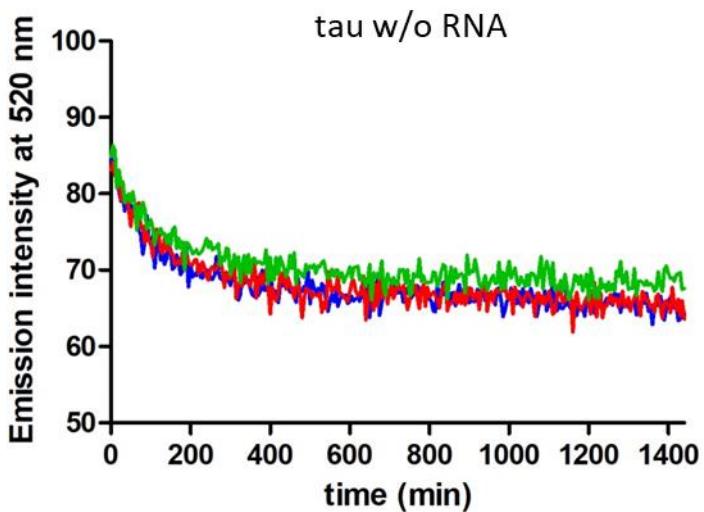
圖 3.41 利用微量盤螢光分光光譜儀測的有含 RNA 的 tau aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表 9 μ M tau w/ RNA 三重複，培養 24 小時，(A) 9 μ M tau w/ RNA；(B) 9 μ M tau w/ RNA + heparin。

我們隨即用沒有 RNA 的 tau 樣品進行測試，使用的濃度為 10 μ M tau，一樣分成不含 heparin 的控制組及含 2.5 μ M heparin 的實驗組進行測試（圖 3.42），結果含 heparin 的組別螢光增加的幅度很大，推測有 tau 纖維的形成，因此我們懷疑 heparin 是否和 RNA 有交互作用而影響纖維的形成。



(A) tau w/o RNA



(B) tau w/o RNA + heparin

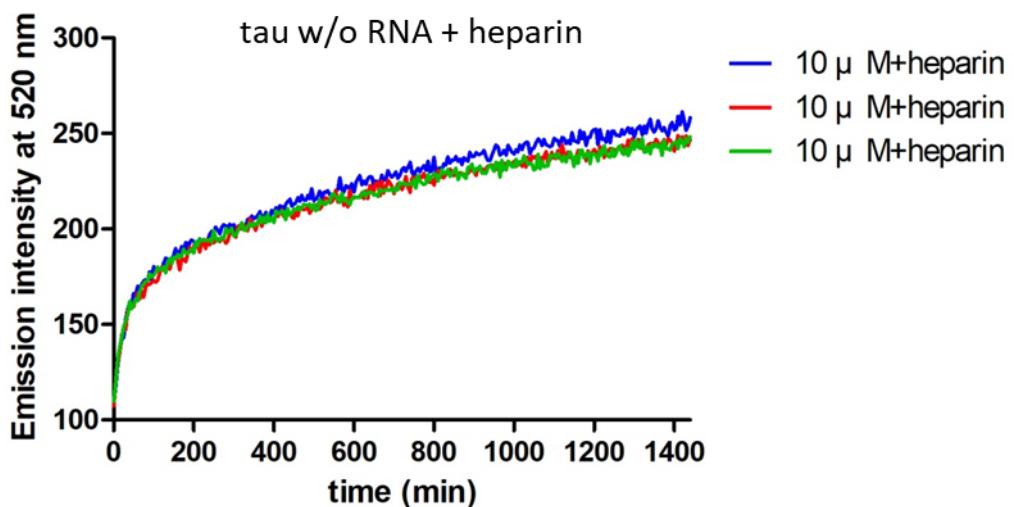


圖 3.42 利用微量盤螢光分光光譜儀測的不含 RNA 的 tau aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線和綠線代表 $10 \mu\text{M}$ tau w/o RNA 三重複，培養 24 小時，(A) $10 \mu\text{M}$ tau w/o RNA；(B) $10 \mu\text{M}$ tau w/o RNA + heparin。



我們也有將 tau / p-tau 用西方墨點法分析，證實樣品中的蛋白質確實是 tau / p-tau 蛋白，結果樣品中確實含有 tau / p-tau (圖 3.43)，但會有許多的降解產物，即使在 SDS-PAGE 圖上看不出來。

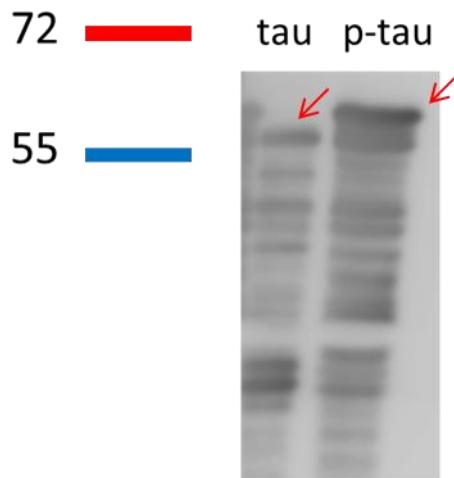


圖 3.43 tau / p-tau 的西方墨點法。

利用西方墨點法分析樣品中是否含有 tau / p-tau，紅色箭頭處即是 tau / p-tau。使用的抗體為 Anti-Tau-1, clone PC1C6 antibody。

我們也使用動態光散射測量 p-tau 的粒徑大小，蒐集經 HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column 純化後的樣品並進行量測，此時樣品還未加入甘油也還未濃縮，樣品所處的溶液為 100 mM NaCl、20 mM Tris 且 pH 為 7.4，測量後得到平均粒徑大小約為 7 nm，代表我們純化後的 p-tau 還沒有聚集形成較大的聚分子 (圖 3.44)。

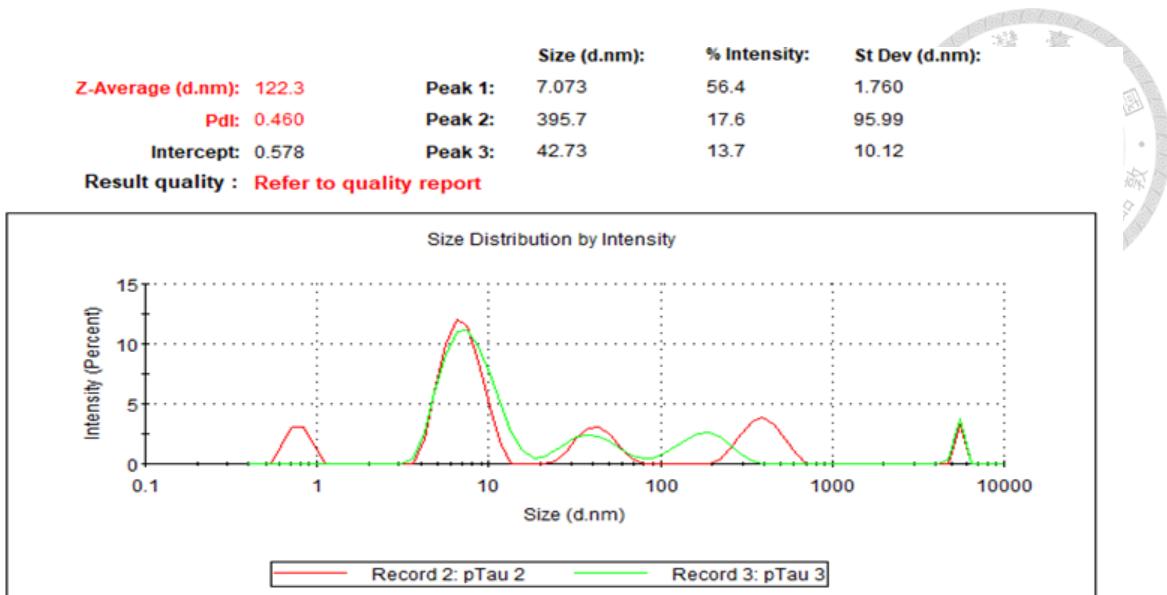


圖 3.44 以動態光散射測量 p-tau 粒徑大小。

用動態光散射測量 p-tau 的粒徑約為 7 nm。

3.4.3 tau 胜肽

在 tau 胜肽的部分，我們使用秤重的方法來配製五種 tau 胜肽的樣品使其濃度為 $200 \mu\text{M}$ ，並和 aggregation buffer 及 ThT 均勻混合，調配濃度為 $50 \mu\text{M}$ tau 胜肽和 $20 \mu\text{M}$ ThT 的樣品，同時準備另一組含有 $50 \mu\text{M}$ tau 胜肽、 $12.5 \mu\text{M}$ heparin 和 $20 \mu\text{M}$ ThT 的樣品，並進行 aggregation test，在測試之前，先測量只含有 aggregation buffer 和 ThT 以及多了 heparin 的控制組，結果螢光訊號皆沒增加（圖 3.45），接著對胜肽進行測試，由結果來看這五種 tau 胜肽在不加 heparin 的條件下都不能自發性地形成纖維，而加了 heparin 的情況下則全部都有螢光訊號的上升（圖 3.46），隨即我們將含有 heparin 的樣品點在 grid 上並進行負染色，再利用 TEM 取像，可以看到許多絲線狀的澱粉樣纖維（圖 3.47）。

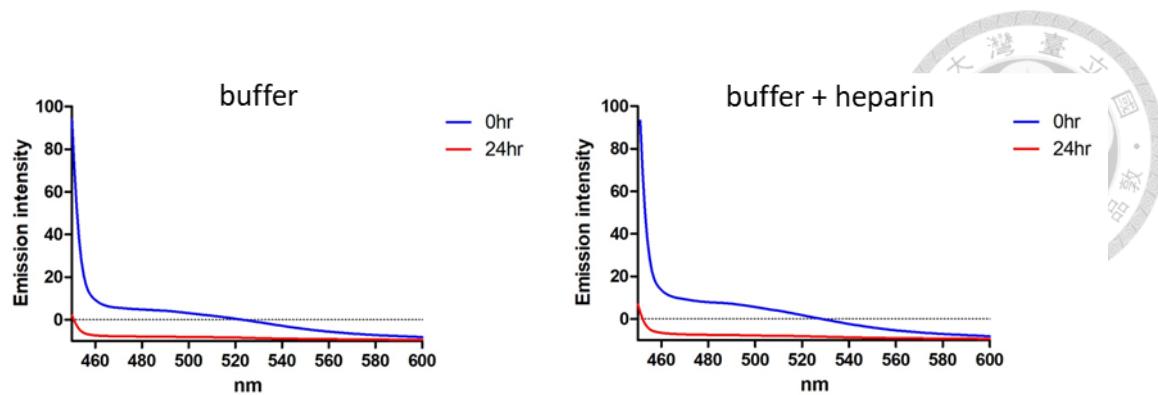
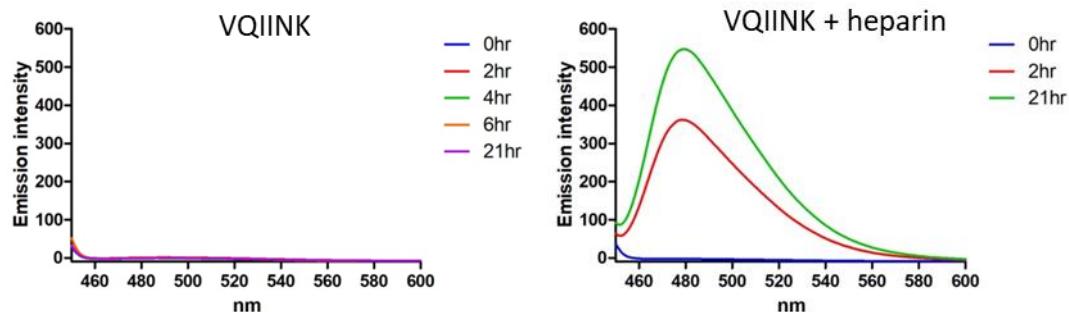


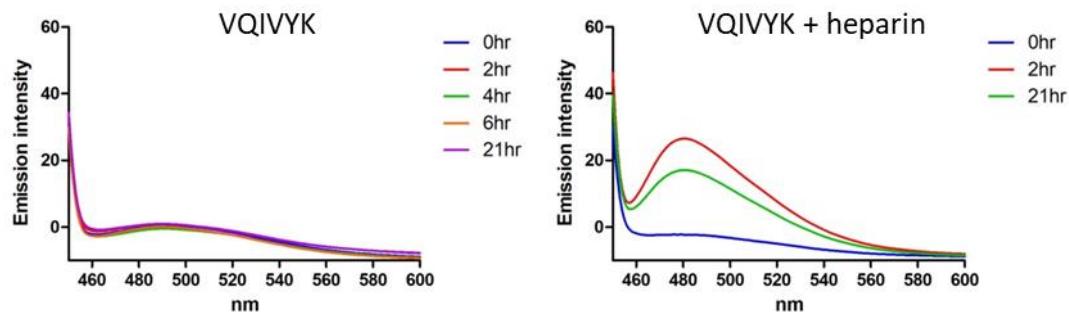
圖 3.45 利用螢光光譜儀測的只含 aggregation buffer 和 heparin 的控制組。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線代表培養 24 小時後的螢光訊號，24 小時後螢光訊號沒有增加。左圖為含有 aggregation buffer 和 ThT 的樣品。右圖為含有 aggregation buffer、heparin 和 ThT 的樣品。

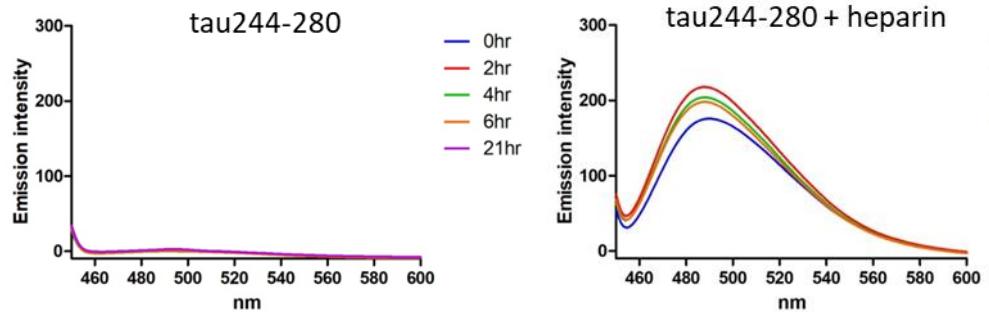
(A) Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂



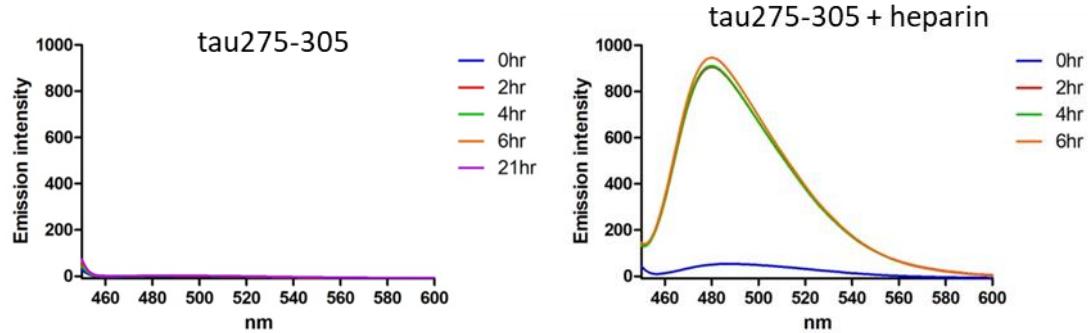
(B) Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂



(C) tau244-280 (R1+PHF6*)



(D) tau275-305 (PHF6*+R2)



(E) tau281-311 (R2+PHF6)

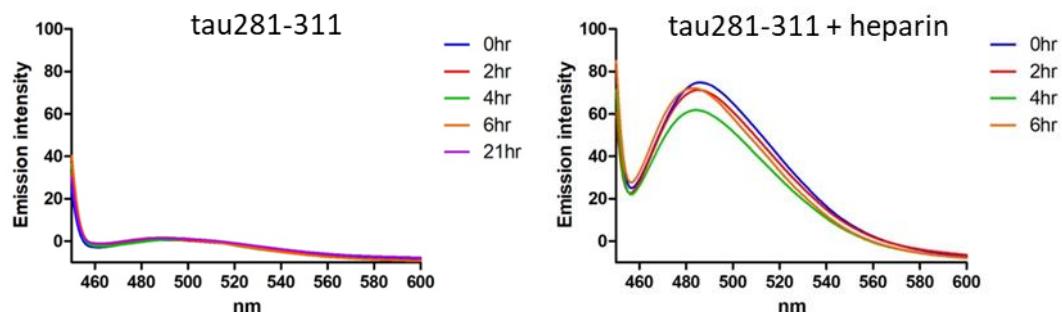
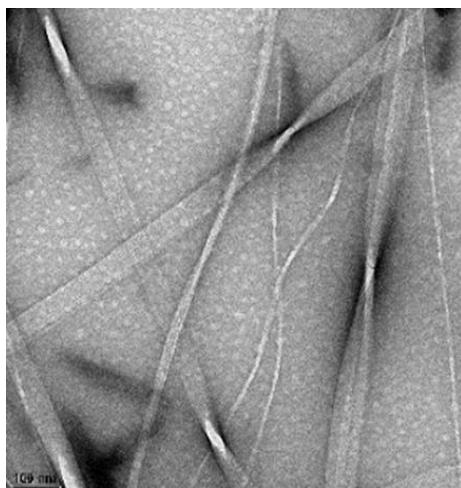




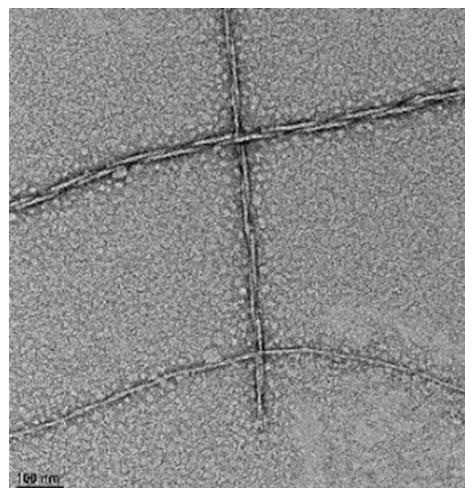
圖 3.46 使用螢光光譜儀測的 tau 胜肽 aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，每一項的左圖為沒有 heparin 的組別，右圖則為含有 heparin 的組別，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線、綠線、橘線和紫線分別代表培養 2、4、6、21 小時後的螢光訊號。(A) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$ 。(B) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ 。(C) $50 \mu\text{M} \text{ tau244-280 (R1+PHF6*)}$ 。(D) $50 \mu\text{M} \text{ tau275-305 (PHF6*+R2)}$ 。(E) $50 \mu\text{M} \text{ tau281-311 (R2+PHF6)}$ 。

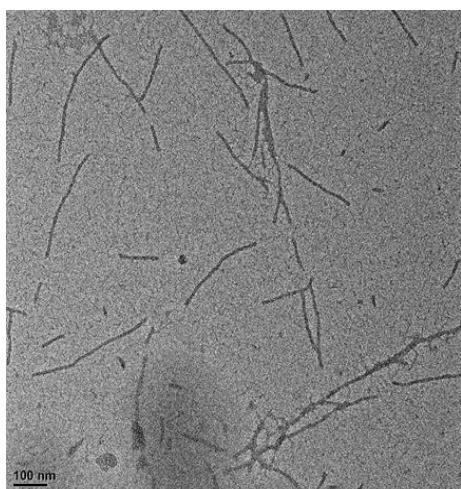
(A) $\text{Ac}^{-275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$



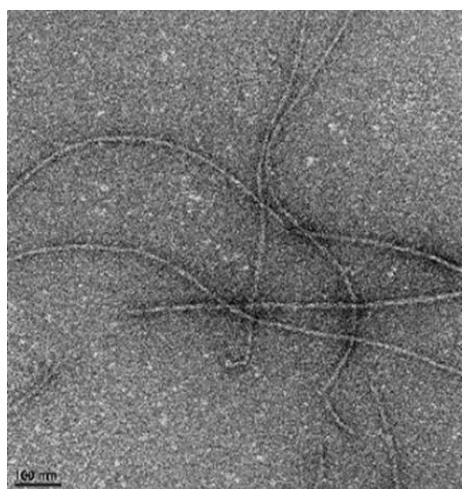
(B) $\text{Ac-306VQIVYK311-NH}_2$



(C) $\text{tau244-280 (R1+PHF6*)}$



(D) $\text{tau275-305 (PHF6*+R2)}$





(E) tau281-311 (R2+PHF6)

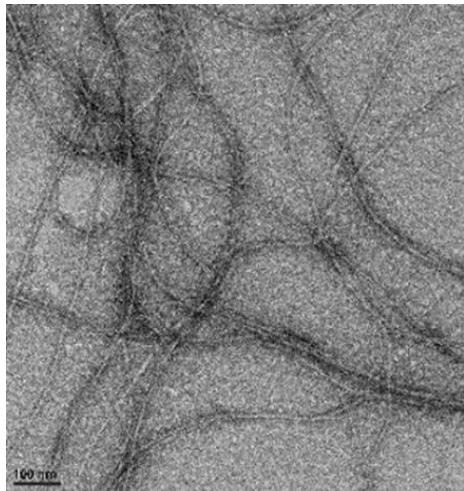


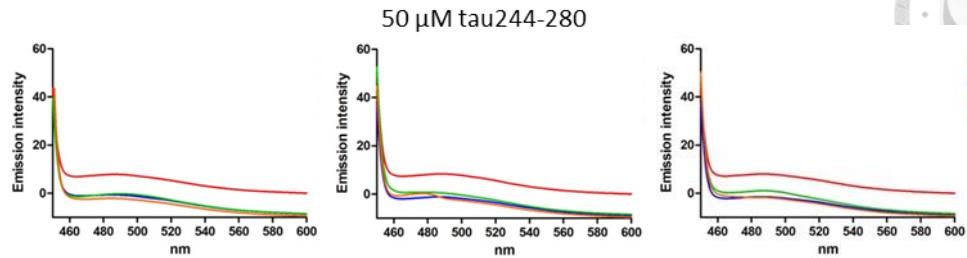
圖 3.47 tau 胜肽纖維的 TEM 照片。

使用 TEM 觀察到的 tau 胜肽纖維。(A) $\text{Ac}^{275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$ ，放大倍率為 19500X。(B) $\text{Ac}^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ ，放大倍率為 19500X。(C) tau244-280 (R1+PHF6*)，放大倍率為 15000X。(D) tau275-305 (PHF6*+R2)，放大倍率為 19500X。(E) tau281-311 (R2+PHF6)，放大倍率為 19500X。比例尺皆為 100 nm。

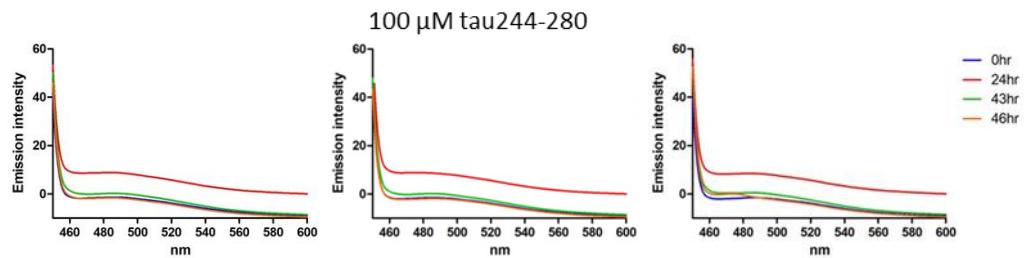
接著我們使用帶有一個磷酸根的 tau244-280 w/ pSer262 進行測試，和相同序列但不帶有磷酸根的 tau244-280 (R2+PHF6*) 一起做測試，從質譜圖來看，tau244-280 w/ pSer262 的純度並不高，有一些磷酸根從胜肽上掉下來，比例約為 3:1，因此我們使用三種濃度來進行三重複測試，分別為 50 μM 、100 μM 及 150 μM ，觀察多一個磷酸根修飾是否會改變該段胜肽形成纖維的能力（圖 3.48），由結果來看並沒有差別，都不會自發性地形成纖維。



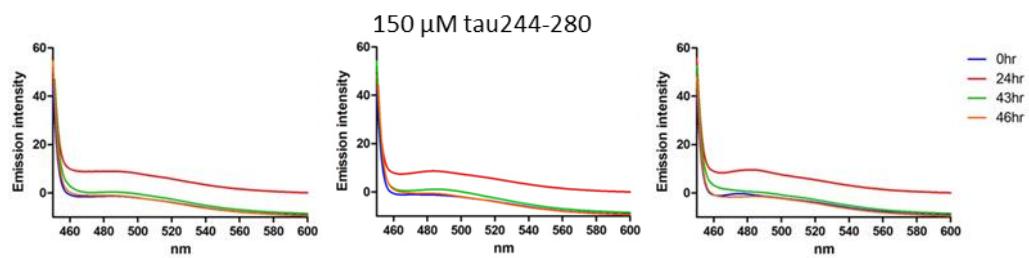
(A) 50 μM tau244-280 (R2+PHF6*)



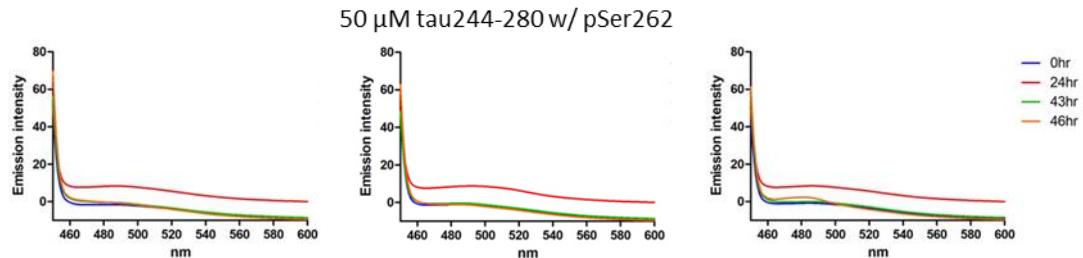
(B) 100 μM tau244-280 (R2+PHF6*)



(C) 150 μM tau244-280 (R2+PHF6*)

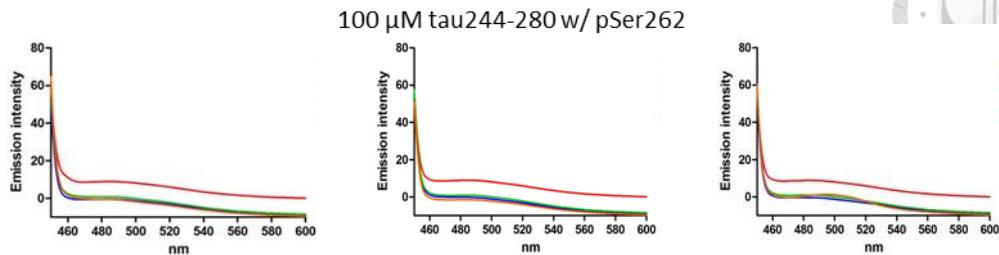


(D) 50 μM tau244-280 w/ pSer262





(E) 100 μM tau244-280 w/ pSer262



(F) 150 μM tau244-280 w/ pSer262

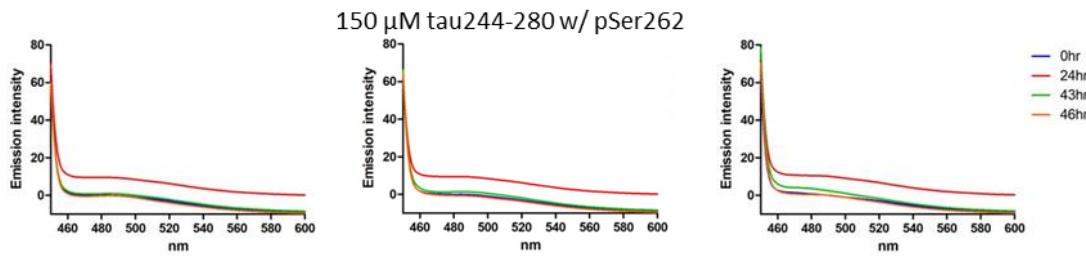


圖 3.48 使用螢光光譜儀測的帶有修飾的 tau 胜肽 aggregation test。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，在三種濃度下進行三重複測試，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線、綠線、橘線代表培養 24、43、46 小時之後的螢光訊號。(A) 50 μM tau244-280 (R2+PHF6*)。 (B) 100 μM tau244-280 (R2+PHF6*)。 (C) 150 μM tau244-280 (R2+PHF6*)。 (D) 50 μM tau244-280 w/ pSer262。 (E) 100 μM tau244-280 w/ pSer262。 (F) 150 μM tau244-280 w/ pSer262。

3.4.4 種晶效應

由先前的實驗結果，我們可以知道在 50 μM 的濃度下，五種 tau peptide 都不會自發性地形成纖維，因此我們使用這個濃度來進行種晶效應的測試。我們將用微孔盤培養的 p-tau / tau 纖維分別收集在一起，接著離心並取出上清液，隨即加入水來清洗沉澱下來的 p-tau / tau 纖維，並再離心一次，取出上清液，此時沉澱的即為乾淨 p-tau / tau 纖維，加入 40 μl 的水並用超音波震碎使其形成 p-tau / tau 種晶。由於 p-tau 的樣品原先含有 RNA，因此首先將 p-tau 第一次離心後的



上清液及種晶分別用水稀釋 100 倍並測量其吸收光譜，用以確認種晶已不含 RNA，由結果來看只有上清液在 254 nm 有吸光值（圖 3.49），代表種晶不含 RNA。

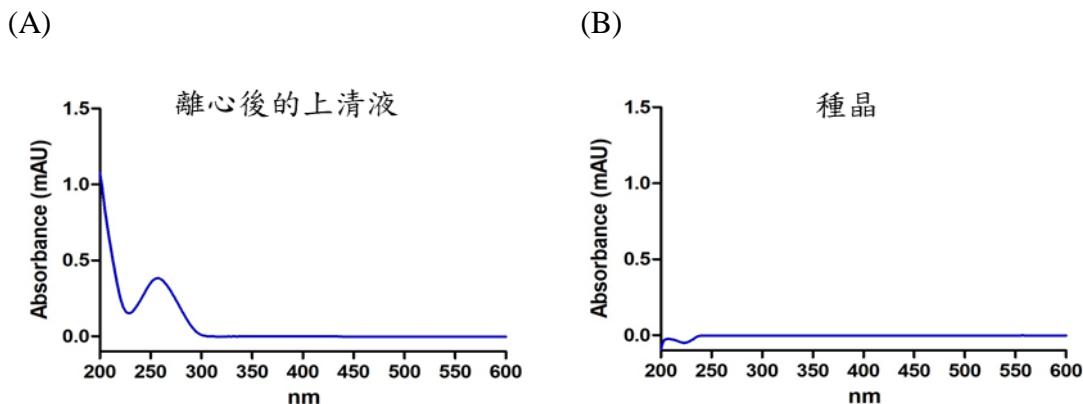
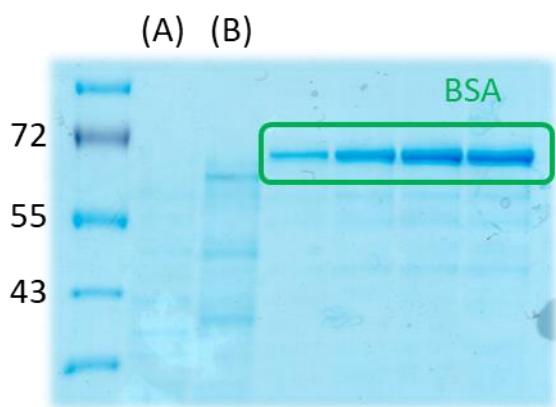


圖 3.49 p-tau 種晶製備過程中的上清液及種晶進行全波長的吸光值測量圖。

縱軸為吸光值，橫軸為波長。(A) 第一次離心後的上清液。在 $UV_{257\text{nm}}$ 有訊號，代表此樣品中含有 RNA。(B) 種晶。沒有訊號，代表不含 RNA。

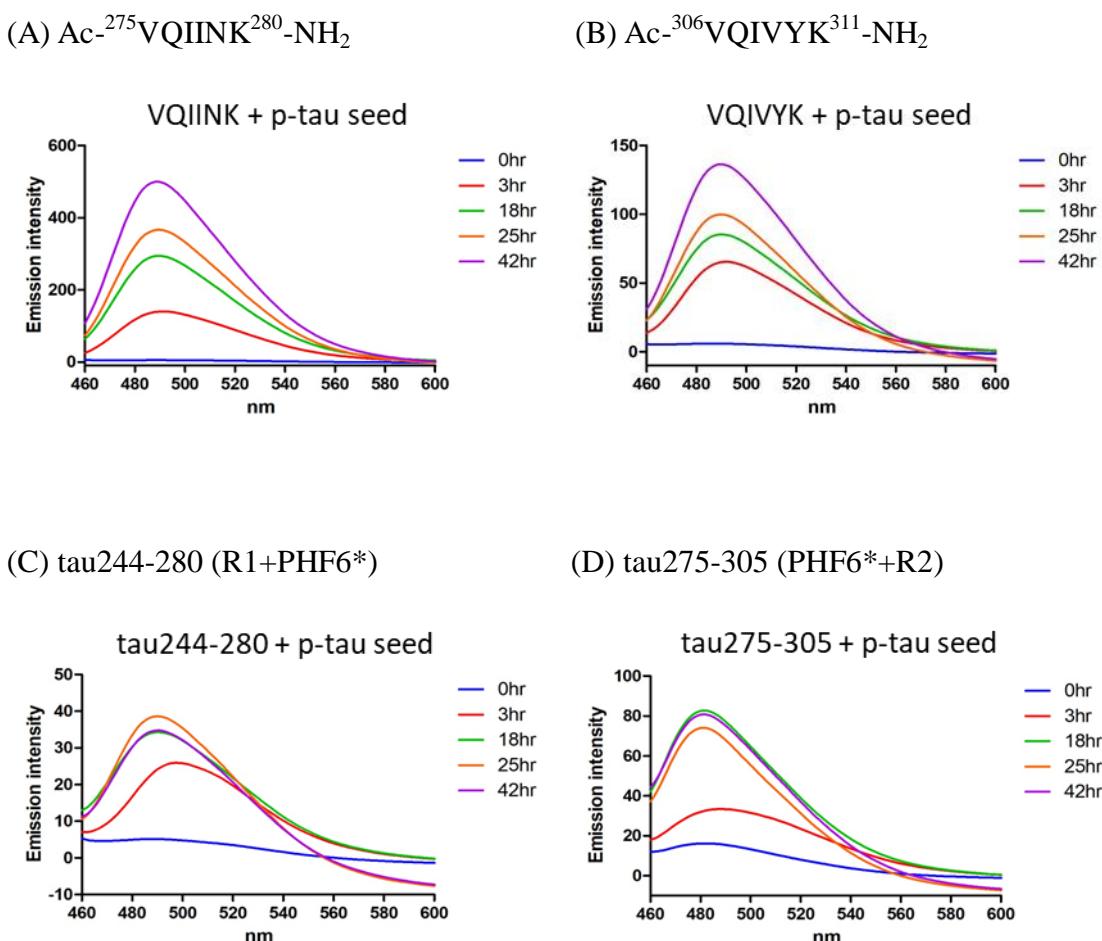
接著我們將上清液使用 SDS-PAGE 進行分析，計算上清液中還存在多少的 p-tau / tau，即可用初始濃度減去上清液 p-tau / tau 濃度得到種晶濃度（圖 3.50），因此就知道要加入多少量的種晶。我們使用 $50 \mu\text{M}$ 的五種勝肽進行測試，和種晶混合使其最後樣品含有 50 pmole 的種晶，樣品中含有 $20 \mu\text{M}$ 的 ThT 且最終體積為 $100 \mu\text{l}$ ，使用螢光光譜儀進行測量，由結果來看 p-tau 種晶可以使這五種勝肽都形成纖維（圖 3.51）而 tau 種晶則不行（圖 3.52），結果和我們原先預想的不同。



(A) : tau 離心後的上清液
(B) : p-tau 離心後的上清液

圖 3.50 製備種晶時的上清液的 SDS-PAGE 圖。

膠片上由左至右為 marker、(A) tau 離心後的上清液、(B) p-tau 離心後的上清液，綠色框線為濃度 $0.2 / 0.4 / 0.6 / 0.8 \text{ mg/ml}$ 的 BSA。依照 BSA 的濃度來為上清液中殘留的 tau / p-tau 進行定量。





(E) tau281-311 (R2+PHF6)

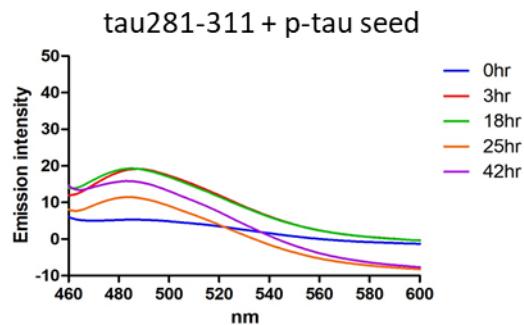
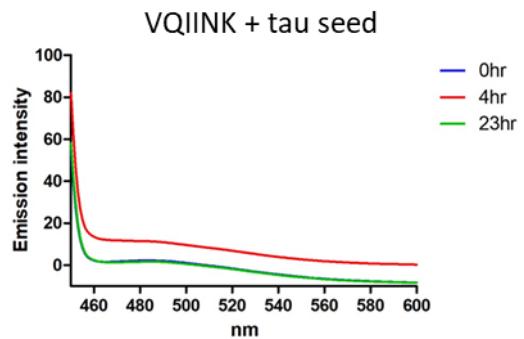


圖 3.51 使用螢光光譜儀測的 p-tau 種晶效應。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線、綠線、橘線和紫線代表培養 3、18、25、42 小時候的螢光訊號。(A) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2 + \text{p-tau seed}$ 。(B) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2 + \text{p-tau seed}$ 。(C) $50 \mu\text{M} \text{ tau244-280 (R1+PHF6*)} + \text{p-tau seed}$ 。(D) $50 \mu\text{M} \text{ tau275-305 (PHF6*+R2)} + \text{p-tau seed}$ 。(E) $50 \mu\text{M} \text{ tau281-311 (R2+PHF6)} + \text{p-tau seed}$ 。

(A) $\text{Ac}^{-275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$



(B) $\text{Ac}^{-306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$

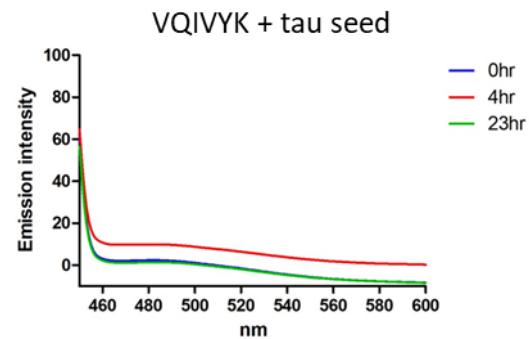


圖 3.52 使用螢光光譜儀測的 tau 種晶效應。

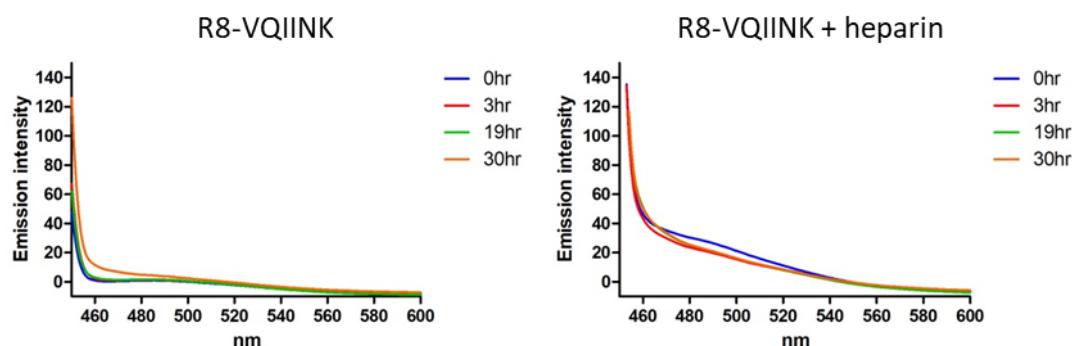
縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線和綠線代表培養 4 小時和 23 小時後的螢光訊號。(A) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2 + \text{tau seed}$ 。(B) $50 \mu\text{M} \text{ Ac}^{-306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2 + \text{tau seed}$ 。



3.4.5 胜肽抑制物

首先我們使用了兩種不同的濃度測試設計的兩種胜肽抑制物是否會自己形成澱粉樣纖維，使用 $50 \mu\text{M}$ 的濃度進行測試，而且同時做了另外一組含有 heparin 的組別，同樣使用 $20 \mu\text{M}$ ThS 當作螢光染劑，在 37°C 環境下進行培養，由結果來看不管有沒有加入 heparin，這兩種胜肽抑制物都不會形成纖維（圖 3.53）。

(A) R8-VQIINK



(B) R8-VQIVYK

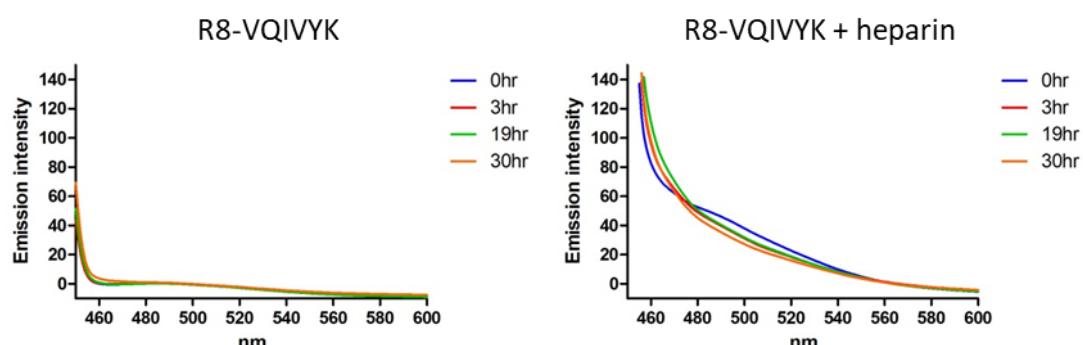


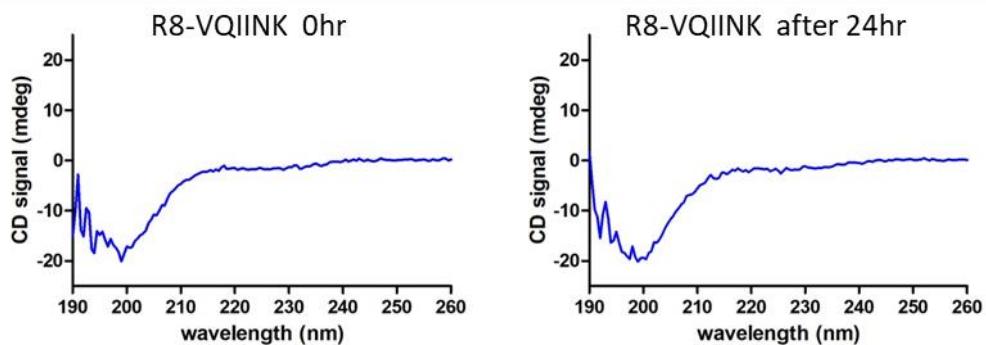
圖 3.53 使用螢光光譜儀測量胜肽抑制物是否會形成纖維。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，各組左圖為沒有加 heparin 的組別；右圖則為有加 heparin 的組別，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線、綠線和橘線代表培養 3、19、30 小時後的螢光訊號。(A) R8-VQIINK。(B) R8-VQIVYK。



接著我們另外培養了一組濃度為 $100 \mu\text{M}$ 且沒有加 heparin 的組別，並在培養 24 小時前後以圓二色光譜儀測量，觀察在培養前後的二級結構有無變化，從圖形來看兩者之間並沒有差別（圖 3.54），主要的結構皆為無規則線圈（random coil），代表培養前後的主要二級結構並沒有改變，和先前的螢光結果相應，設計的兩種勝肽抑制物皆不會形成纖維。

(A) R8-VQIINK



(B) R8-VQIVYK

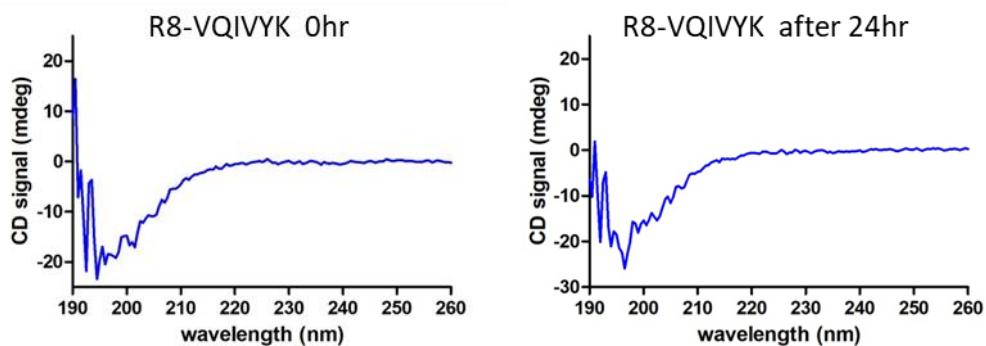


圖 3.54 使用圓二色光譜儀測量勝肽抑制物的二級結構。

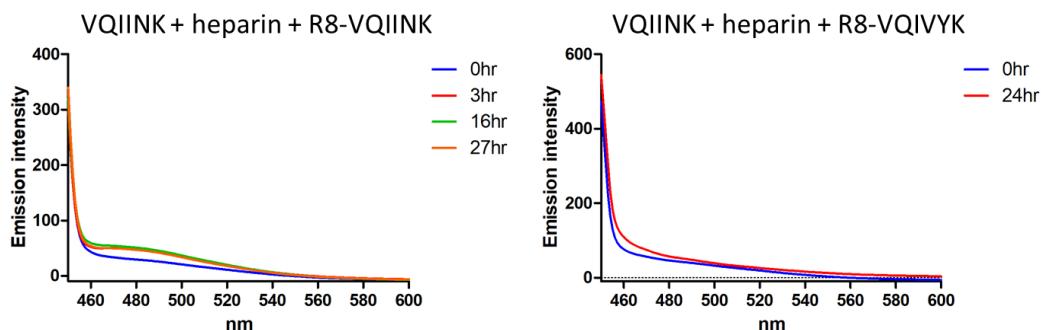
縱軸為橢圓率，橫軸為波長，各組左圖為培養前的圖譜；右圖則為培養後的圖譜。

(A) R8-VQIINK。(B) R8-VQIVYK。

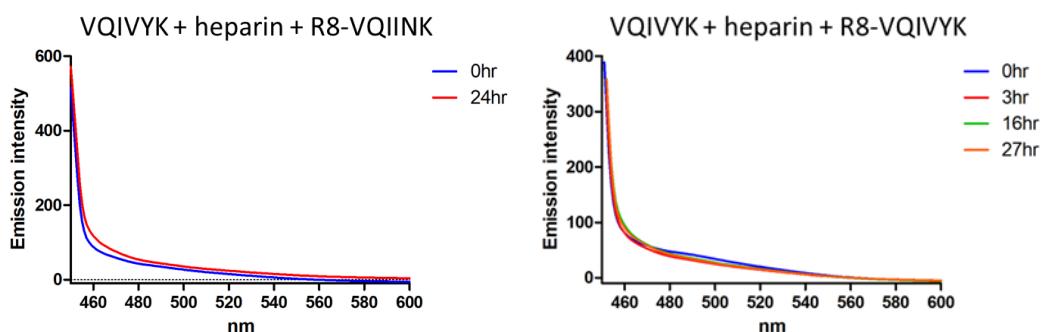


確認了胜肽抑制物不會自己形成纖維後，隨即先將合成的五種胜肽進行測試，五種胜肽樣品的濃度為 50 μM ，其中含有 12.5 μM heparin 以及 20 μM ThT，再加入 50 μM 的胜肽抑制物，使用螢光光譜儀觀察是否有抑制效果，原本有含 heparin 會促使纖維的形成，加了胜肽抑制物後就沒有螢光訊號的增加，因此不論是哪一種胜肽抑制物皆對這五種胜肽有抑制效果（圖 3.55）。

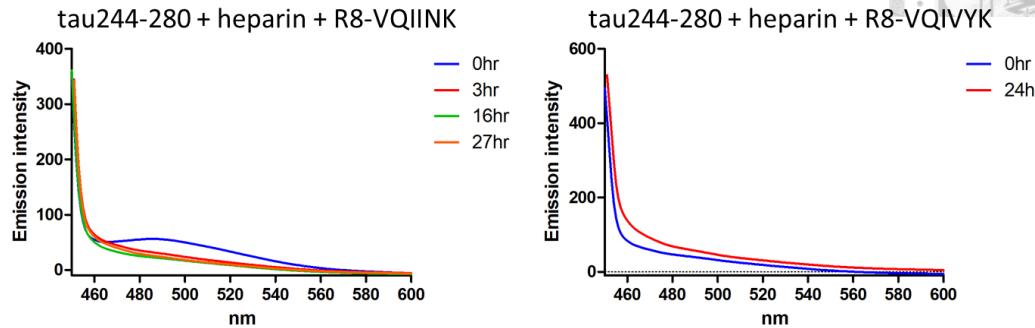
(A) Ac-²⁷⁵VQIINK²⁸⁰-NH₂



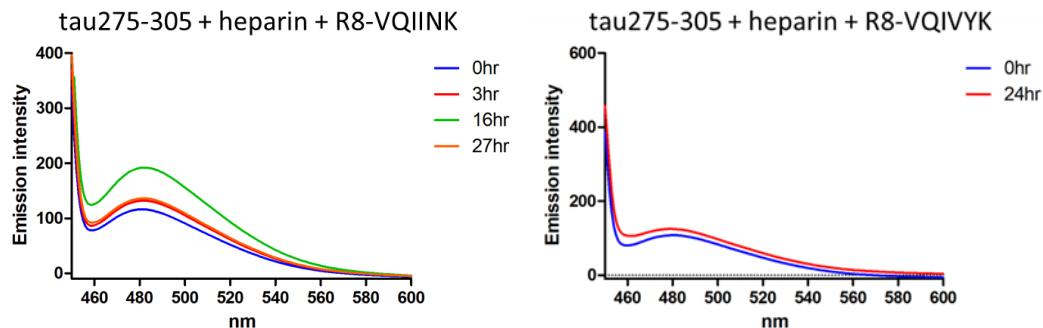
(B) Ac-³⁰⁶VQIVYK³¹¹-NH₂



(C) tau244-280 (R1+PHF6*)



(D) tau275-305 (PHF6*+R2)



(E) tau281-311 (R2+PHF6)

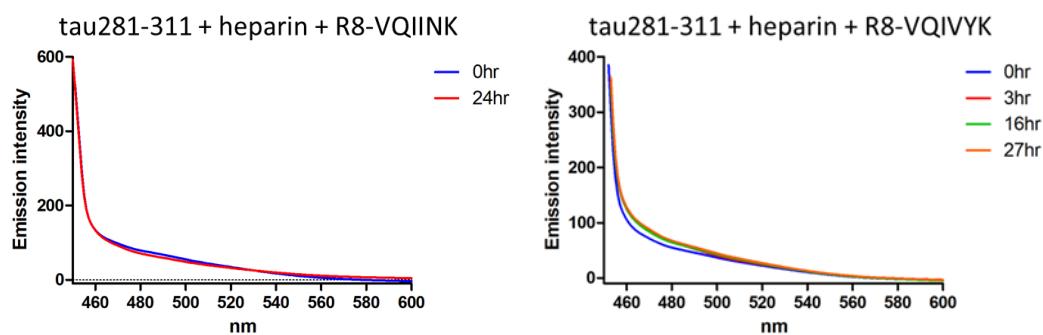


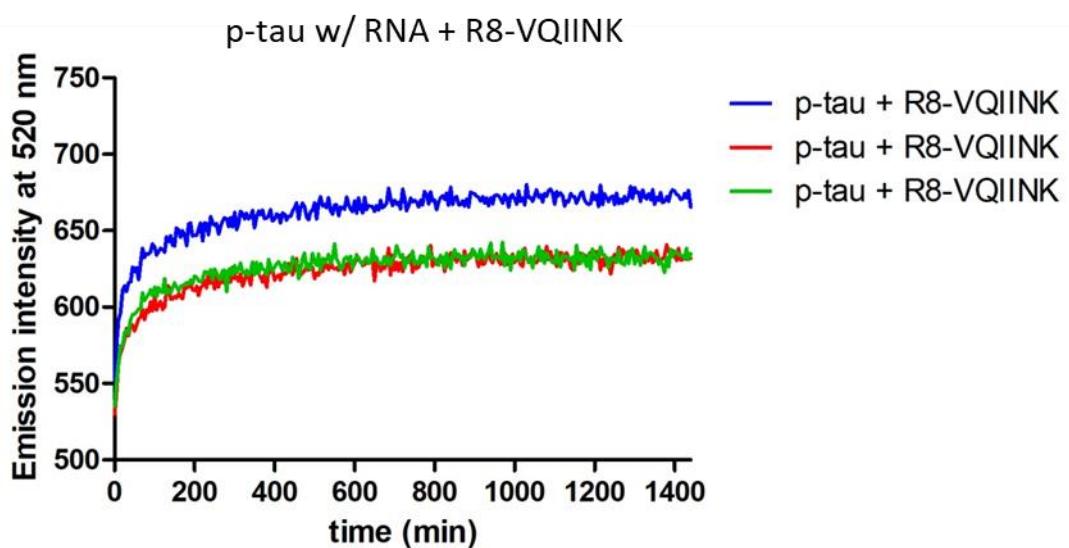


圖 3.55 使用螢光光譜儀測量胜肽抑制物對五種胜肽的抑制效果。

縱軸為螢光訊號，橫軸為波長，各組左圖為加入 R8-VQIINK 共同培養的組別，右圖則為加入 R8-VQIVYK 的組別，藍線代表培養前的螢光訊號，紅線、綠線和橘線代表培養 3、16、27 小時後的螢光訊號。(A) $\text{Ac}^{275}\text{VQIINK}^{280}\text{-NH}_2$ 。(B) $\text{Ac}^{306}\text{VQIVYK}^{311}\text{-NH}_2$ 。(C) tau244-280 (R1+PHF6*)。(D) tau275-305 (PHF6*+R2)。(E) tau281-311 (R2+PHF6)。

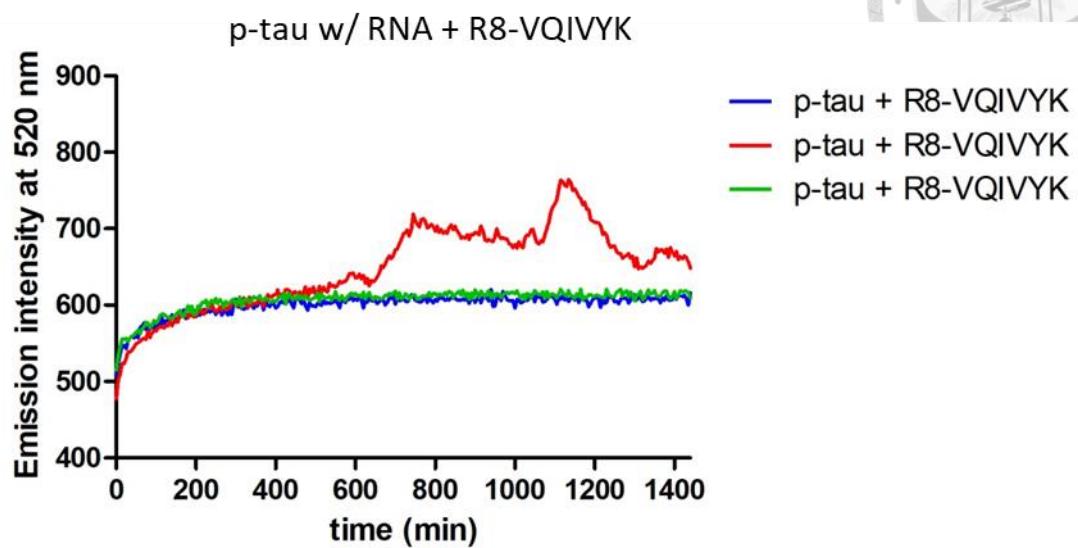
最後，我們使用微量盤螢光分光光譜儀測試含有 RNA 的 p-tau 及含有 heparin 但不含 RNA 的 tau 是否也能被胜肽抑制物抑制，使用的 p-tau / tau 濃度皆為 $10 \mu\text{M}$ ，tau 的組別加入 $2.5 \mu\text{M}$ heparin，兩組皆含有 $20 \mu\text{M}$ ThS，和 $20 \mu\text{M}$ 兩種胜肽抑制物共同培養 24 小時，三重複實驗的結果顯示該兩種胜肽抑制物對 p-tau 沒有抑制效果，但對 tau 有抑制效果（圖 3.56）。

(A) p-tau w/ RNA + R8-VQIINK

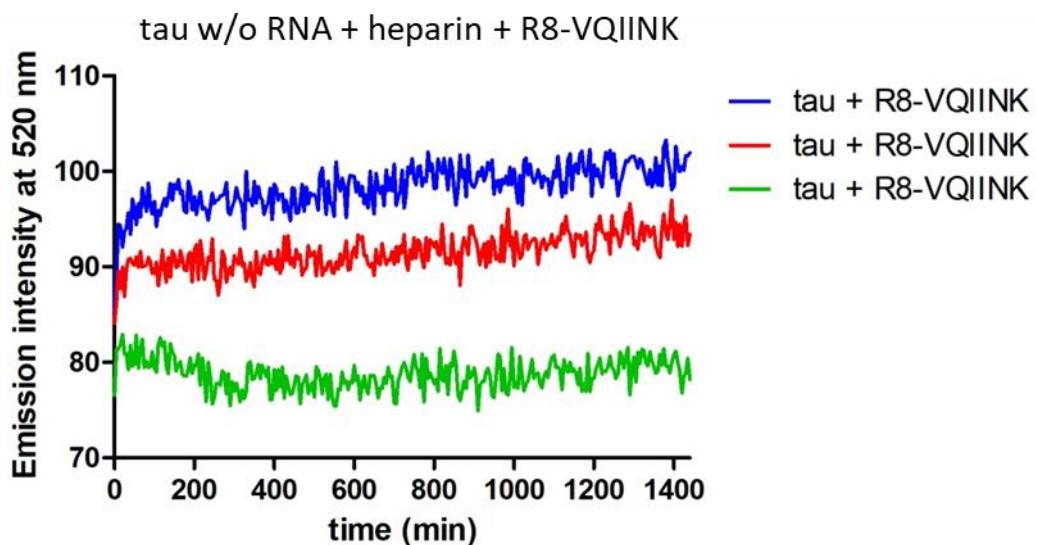




(B) p-tau w/ RNA + R8-VQIVYK



(C) tau w/o RNA + heparin + R8-VQIINK





(D) tau w/o RNA + heparin + R8-VQIVYK

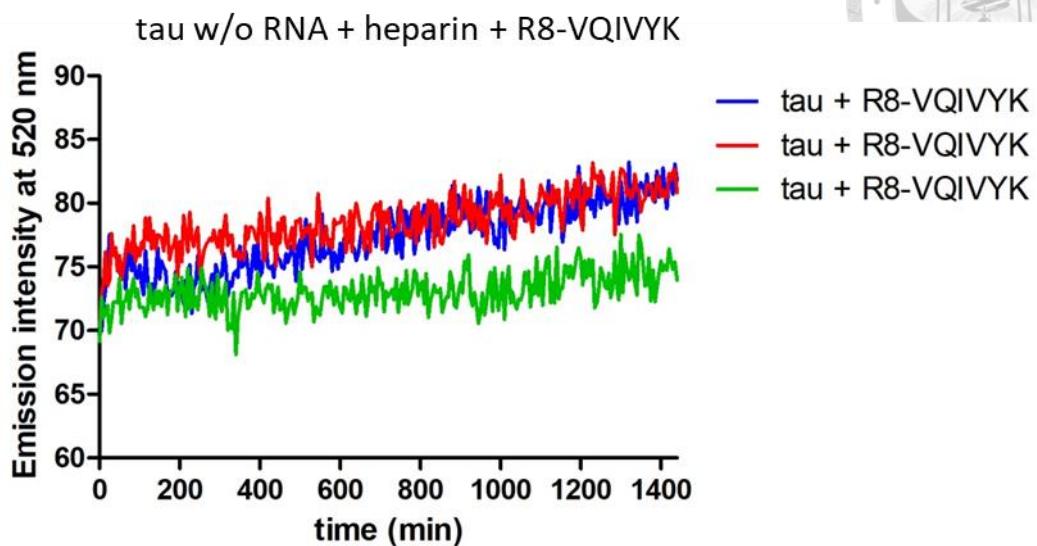


圖 3.56 利用微量盤螢光分光光譜儀測量胜肽抑制物對含有 RNA 的 p-tau 及含有 heparin 但不含 RNA 的 tau 的抑制效果。

縱軸為螢光訊號，橫軸為時間，藍線、紅線、綠線代表三重複。(A) 10 μM p-tau w/ RNA + 20 μM R8-VQIINK。(B) 10 μM p-tau w/ RNA + 20 μM R8-VQIVYK。(C) 10 μM tau w/o RNA + 2.5 μM heparin + 20 μM R8-VQIINK。(D) 10 μM tau w/o RNA + 2.5 μM heparin + 20 μM R8-VQIVYK。

第四章 討論



我們在實驗最初步的純化過程中遇到很多困難，當我們發現樣品中帶有 RNA 汚染時，即做了很多方法想要去除 RNA，以避免在後續實驗中 RNA 會影響實驗結果，甚至會影響纖維的結構，因而做了很多的去除 RNA 實驗，包括了使用 Ni-NTA 管柱和硫胺沉澱法，結果都沒有辦法去除掉全部的 RNA，直到使用了 HiTrap CM Sepharose FF 陽離子交換樹脂管柱才成功把 RNA 去除。拿到不含 RNA 的 p-tau 後，隨即進行聚集測試，結果螢光訊號都沒有增加，顯示 p-tau 並沒有成功形成纖維，因此又回到了最初的原點，和老師討論並檢視失敗的原因後，我們決定回歸最原始的純化步驟，即是純化出帶有 RNA 的樣品，再進行一次聚集測試，沒想到這次就成功了，因此我們推測 p-tau 的系統中，想要形成纖維就必須要有 RNA 的協助，也有其他研究指出 RAN 可以促使 tau 形成纖維 (Kampers, Friedhoff et al. 1996)，但在 tau 聚集測試的結果中，含有 RNA 的 tau 雖然在聚集測試的結果中看起來只有一點螢光訊號增強，但是增強的幅度相較 p-tau 較小，很難單從圖形上判定有沒有 tau 纖維的形成，而在含有 RNA 的 tau 加入 heparin 之後也沒看到螢光訊號的增強，推測 RNA 可能會阻止 tau 和 heparin 的作用，因此之後還要重複確認 RNA 在 tau 形成纖維中扮演的角色。

除了 RNA 汚染的問題外，我們也發現純化的產量不多以及有一些降解產物的問題，在產量的方面我們曾經嘗試過同時將 2 L 的菌液一起進行純化，但在進行 FPLC 管柱純化時就會導致目標產物 tau / p-tau 和其它的雜質蛋白質分不開的情形，導致純化後的樣品純度不高，因此在進行 FPLC 管柱純化時只能將 2 L 菌液的樣品分兩次注入管住中，最後再將取出的樣品濃縮在一起，以提高樣品濃度；在部分樣品降解的方面，我們則是盡量在最短的時間內純化，從破菌的步驟開始到結束都在二至三天內完成，雖然之前為了改良降解問題而採用的液態氮冷凍破菌法結合直接煮沸法看起來可以有效減少樣品的降解，但也會造成產率降低，



並可能導致樣品品質較差而影響後續培養成纖維的表現，因此後來我們就沒有繼續採用這樣的方法來進行破菌了。

在勝肽合成的部分，有一些經過 HPLC 管柱純化後的樣品純度依然沒有很高，因為在管柱純化中很難將目標產物及只少了一個胺基酸的次產物分離開來，但我們還是決定先繼續做下去看看有沒有效果。將純化後的五種勝肽進行聚集測試，在 $50 \mu\text{M}$ 濃度下，只有加入 heparin 的組別有形成纖維，而且在電子顯微鏡下都有觀察到纖維的絲狀結構，隨即將準備的 p-tau / tau 種晶加入勝肽一起培養，由螢光訊號結果來看，p-tau 種晶可以促使五種勝肽纖維的形成，但是 tau281-305 (R2+PHF6*) 增加的螢光訊號比較低，和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 加 heparin 的組別相似，或許 tau281-305 (R2) 對於纖維的形成有干擾效果，也可能 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 片段的螢光量子產率 (fluorescence quantum yield) 本來就比較低而導致螢光訊號比較微弱，而且比較這五種勝肽形成纖維的螢光訊號變化，在加了 heparin 的組別中，可以發現對於 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 來說，如果在 N 端多了一段 R1 序列的 tau244-280 (R1+PHF6*) 則會讓訊號增加的幅度減少；在加了 p-tau 種晶的組別中， $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 在 N 端多了一段 R2 序列的 tau281-311 (R2+PHF6) 也讓訊號增加的幅度減少（圖 4.1），推測或許在 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 前面多了 R1 及 R2 片段會影響纖維的形成，可能有抑制的效果。種晶實驗結果也和我們原先預期的不一樣，我們一開始認為 p-tau 種晶只可以促使含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 的勝肽形成纖維，沒想到連含有 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 的勝肽也會被促使形成纖維，代表 p-tau 纖維會利用這兩段序列堆疊形成纖維，這結果就和其他研究認為 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 沒有被包含在纖維核心區域的結構不同 (Fitzpatrick, Falcon et al. 2017)，或許我們所培養出來的 p-tau 纖維結構和細胞內真實的纖維結構其實不一樣；tau 種晶則是無法促使 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 勝肽形成纖維，這代表 tau 纖維的形成與這兩個區域沒有關係，但這就和其他研究的結果完全不同，



也有可能是因為處理種晶樣品的差異導致種晶的品質不好，才造成實驗的結果有誤。

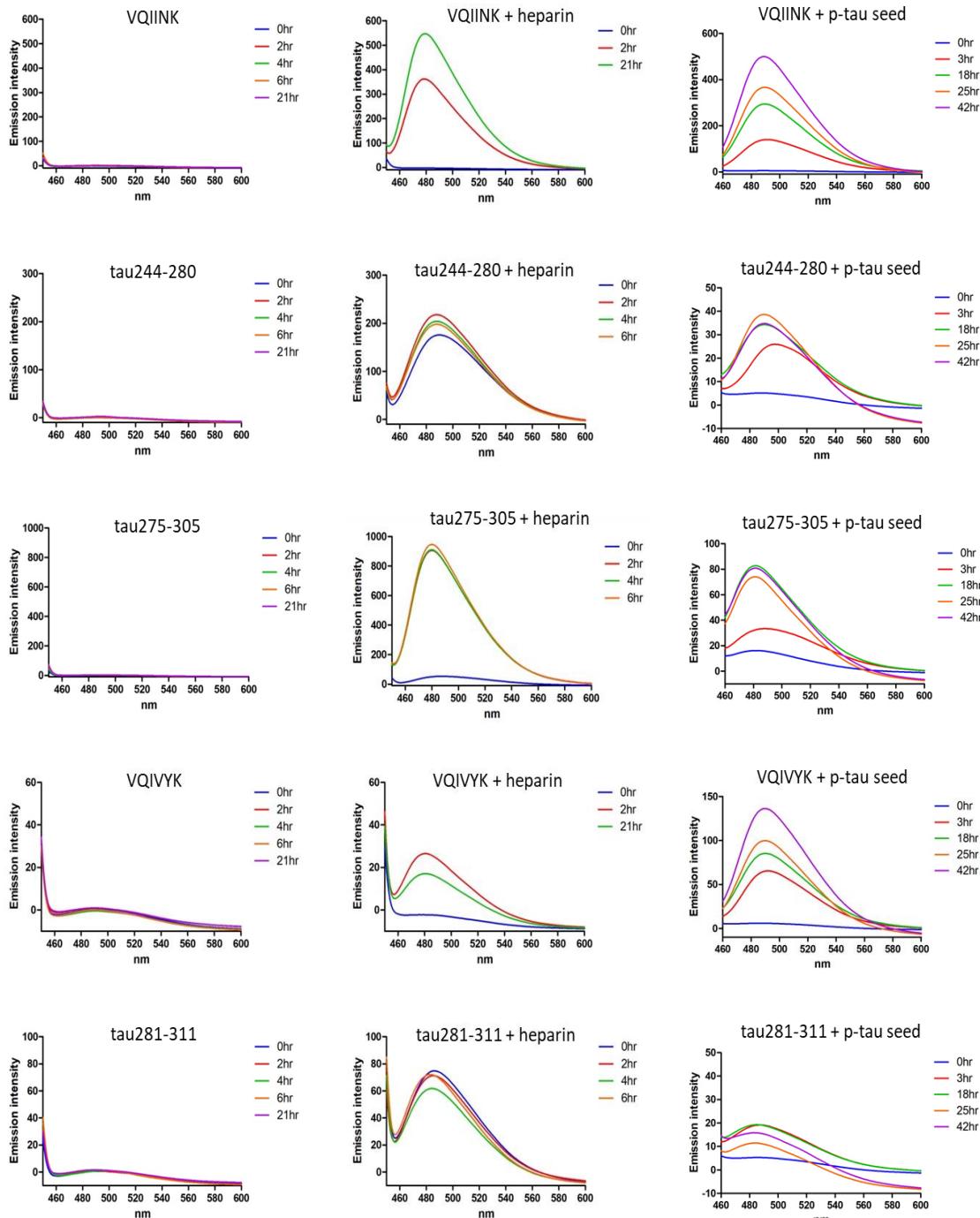
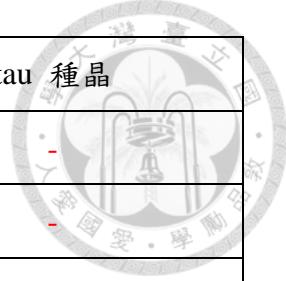


圖 4.1 種晶實驗統整圖。



我們合成了一條帶有磷酸化修飾的胜肽，雖然純度並不高，但因為時間上還有成本上的考量，我們還是先用這批樣品進行實驗，做了三個不同濃度的三重複實驗，最高濃度高達 $150 \mu\text{M}$ ，結果都沒有辦法自發性地形成纖維，我們認為對這條胜肽來說，在 Ser262 的磷酸根沒有辦法協助 tau244-280 形成纖維，或是該胜肽一定要有 heparin 來協助其形成纖維。

在胜肽抑制物的測試中，兩種胜肽抑制物皆可以抑制五種胜肽形成纖維，和我們原本認為 R8-VQIINK 只能抑制含有 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 的胜肽形成纖維；而 R8-VQIVYK 則只能抑制含有 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 的胜肽形成纖維，結果卻都有抑制效果，因此我們推測這兩種抑制物抑制的效果可能不是針對結構，而是利用本身帶有的高度正電荷和帶有負電荷的 heparin 作用而抑制了 heparin 的效果，才會導致對五種胜肽都有抑制效果。在抑制蛋白質的部分，兩種抑制物都不能抑制 p-tau 形成纖維，但是卻可以抑制 tau，讓我們更懷疑是否這兩種胜肽抑制物真的是抑制 heparin 的效果，之後可以用其他帶有高度正電荷的胜肽進行測試看我們的推論是否正確，若真的是如此，只要是高度正電荷的胜肽都可以抑制含有 heparin 的樣品形成纖維，那代表我們的設計需要改良。我們也推測是否是因為 8 個 Arg 接在胜肽的 N 端而導致抑制效果不好，因為從其他研究中可以看到 tau / p-tau 纖維中的 β 摺版結構從 $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ 和 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 開始 (Fitzpatrick, Falcon et al. 2017, Zhang, Falcon et al. 2019)，接著在這兩個核心區域後面還有其他 β 摺版結構，如果 8 個 Arg 是接在胜肽的 C 端，或許可以阻止後面的片段堆疊，可能會有比較好的抑制效果。



	p-tau 種晶	tau 種晶
$^{275}\text{VQIINK}^{280}$	+	-
$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$	+	-
tau244-280 (R1+PHF6*)	+	
tau275-305 (PHF6*+R2)	+	
tau281-311 (R2+PHF6)	+	

表 4.1 種晶實驗結果統整表。

表格中的「+」代表種晶可以促使勝肽形成纖維；「-」代表種晶不能促使勝肽形成纖維，紅色字體代表和預測相反的結果。

	R8-VQIINK	R8-VQIVYK
$^{275}\text{VQIINK}^{280}$ + heparin	+	+
$^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ + heparin	+	+
tau244-280 (R1+PHF6*) + heparin	+	+
tau275-305 (PHF6*+R2) + heparin	+	+
tau281-311 (R2+PHF6) + heparin	+	+
tau w/o RNA + heparin	+	+
p-tau w/ RNA	-	-

表 4.2 勝肽抑制物實驗結果統整表。

表格中的「+」代表勝肽抑制物可以抑制勝肽或蛋白質形成纖維；「-」代表勝肽抑制物不能抑制勝肽或蛋白質形成纖維，紅色字體代表和預測相反的結果。

第五章 未來展望

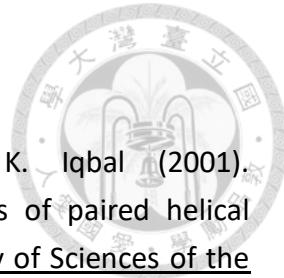


從這次的實驗來看，雖然我們成功純化出 p-tau 並且可以順利地形成 p-tau 纖維，但是產量卻非常的低而且樣品含有 RNA，產量低的部分之後可以嘗試使用不同條件去培養細菌或是改變破菌的方法，看能不能提高產率，不然每次純化後的樣品都只有一點點，很快就會耗盡，亦或是同時進行很大量的純化再將樣品收集在一起，若這麼做就要注意時間上的安排，不讓每一批樣品的製備時間相差太多以影響蛋白質品質；樣品中含有 RNA 的部分則是另一個問題，我們無法得知在真實情況下細胞內的 RNA 是否也會和 p-tau 有交互作用，由實驗結果來看，p-tau 沒有 RNA 就不能自發性地形成纖維，假設純化出的 p-tau 和真實細胞內的 p-tau 相似，那是否代表細胞內的 p-tau 也會被 RNA 影響呢？這是我們可以再思考的問題，之後也要測試沒有含 RNA 的 p-tau 是否可以被 heparin 協助形成纖維。這次在進行 LC-MS/MS 分析中只看到一個被磷酸化修飾的位點，之後在進行磷酸化修飾的分析時可以改變處理樣品的方法，多進行一步放大磷酸化訊息的步驟，將除了有被磷酸化的勝肽片段之外的勝肽先篩選掉，測試是否就能看到比較多的磷酸化訊號。tau 的部分則是還欠缺一個良好的系統，我們還沒有辦法確認 tau 形成纖維的條件是否正確，需要由 TEM 拍到 tau 纖維才可以證實我們所看到的螢光訊號增強是由於樣品真的有形成纖維，這部分尚需進行實驗測試，待取得 tau 纖維後隨即可以進行 tau 的種晶測試，看 tau 種晶是否能促使我們合成的五種勝肽形成纖維，也可以用 p-tau 種晶對 tau 進行測試，看 p-tau 種晶是否在不需要 heparin 的情況下能促使 tau 形成纖維，同時探討 RNA 對 tau 形成纖維的影響。p-tau 種晶在促使 $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ 和 tau₂₈₁₋₃₁₁ (R2+PHF6) 形成纖維的實驗中得到比較低的螢光訊號，有可能是 tau₂₈₁₋₃₀₅ 對纖維的形成有干擾作用，之後我們會測試 p-tau 會不會被 tau₂₈₁₋₃₁₁ (R2+PHF6) 抑制。在帶有修飾的勝肽實驗部分，這次合成的 tau₂₄₄₋₂₈₀ w/ pSer262 並沒有形成纖維，我想之後可以再合成其他種帶有修飾的勝肽來進行測試，並且在合成、純化的實驗中加快流程，

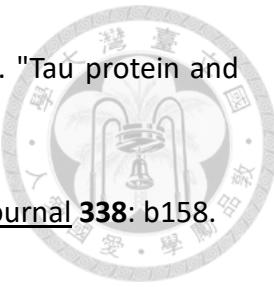


避免這些修飾的基團從胜肽上掉下來導致純度降低。最後在胜肽抑制物的方面，從結果來看有可能只是抑制了 heparin 的作用，之後可以再合成其他種胜肽抑制物進行測試，像是先前提到可以改變 8 個 Arg 的位置，可能對 p-tau 就有抑制效果。建立 p-tau 的系統就可以進行不同抑制物的測試，若在 *in vitro* 實驗中有抑制效果，隨即就可以進行細胞實驗，測試抑制物是否在細胞中依然有抑制效果而且不會對細胞產生毒性，期望未來能找到可以當作治療阿茲海默症或是減緩病情的藥物以協助眾多的病患並減輕社會負擔。

參考文獻



- Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbali and K. Iqbali (2001). "Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(12): 6923-6928.
- Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland and E. Jones (2011). "Alzheimer's disease." The Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Belostozky, A., M. Richman, E. Lisniansky, A. Tovchygrechko, J. H. Chill and S. Rahimipour (2018). "Inhibition of tau-derived hexapeptide aggregation and toxicity by a self-assembled cyclic d, l-alpha-peptide conformational inhibitor." Chemical Communications **54**(47): 5980-5983.
- Berchtold, N. C. and C. W. Cotman (1998). "Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s." Neurobiology of Aging **19**(3): 173-189.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1993). "Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding." Neuron **11**(1): 153-163.
- Biernat, J., Y.-Z. Wu, T. Timm, Q. Zheng-Fischhöfer, E. Mandelkow, L. Meijer and E.-M. Mandelkow (2002). "Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity." Molecular Biology of the Cell **13**(11): 4013-4028.
- Bourré, G., F.-X. Cantrelle, A. Kamah, B. Chamraud, I. Landrieu and C. Smet-Nocca (2018). "Direct crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau protein investigated by NMR spectroscopy." Frontiers in Endocrinology **9**: 595-595.
- Breuzard, G., P. Hubert, R. Nouar, T. De Bessa, F. Devred, P. Barbier, J. N. Sturgis and V. Peyrot (2013). "Molecular mechanisms of tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells." Journal of Cell Science **126**(13): 2810-2819.



Bulic, B., M. Pickhardt, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (2010). "Tau protein and tau aggregation inhibitors." Neuropharmacology **59**(4-5): 276-289.

Burns, A. and S. Iliffe (2009). "Alzheimer's disease." British Medical Journal **338**: b158.

Carlomagno, Y., D.-E. C. Chung, M. Yue, M. Castanedes-Casey, B. J. Madden, J. Dunmore, J. Tong, M. DeTure, D. W. Dickson, L. Petrucelli and C. Cook (2017). "An acetylation-phosphorylation switch that regulates tau aggregation propensity and function." The Journal of Biological Chemistry **292**(37): 15277-15286.

Cheng, Y. S., Z. T. Chen, T. Y. Liao, C. Lin, H. C. Shen, Y. H. Wang, C. W. Chang, R. S. Liu, R. P. Chen and P. H. Tu (2017). "An intranasally delivered peptide drug ameliorates cognitive decline in Alzheimer transgenic mice." EMBO Molecular Medicine **9**(5): 703-715.

Cho, J.-H. and G. V. Johnson (2003). "Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites differential impact on microtubule binding." Journal of Biological Chemistry **278**(1): 187-193.

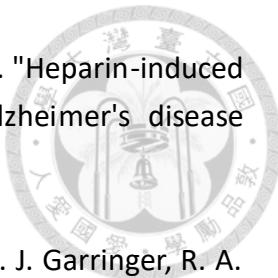
Chun, W. and G. V. Johnson (2007). "The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death." Frontiers in Bioscience **12**: 733-756.

Cohen, T. J., J. L. Guo, D. E. Hurtado, L. K. Kwong, I. P. Mills, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2011). "The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation." Nature Communications **2**: 252.

Cook, C., Y. Carlomagno, T. F. Gendron, J. Dunmore, K. Scheffel, C. Stetler, M. Davis, D. Dickson, M. Jarpe, M. DeTure and L. Petrucelli (2014). "Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance." Human Molecular Genetics **23**(1): 104-116.

Daebel, V., S. Chinnathambi, J. Biernat, M. Schwalbe, B. Habenstein, A. Loquet, E. Akoury, K. Tepper, H. Müller, M. Baldus, C. Griesinger, M. Zweckstetter, E. Mandelkow, V. Vijayan and A. Lange (2012). " β -Sheet core of tau paired helical filaments revealed by solid-state NMR." Journal of the American Chemical Society **134**(34): 13982-13989.

Ferrer, I., G. Santpere and F. W. van Leeuwen (2008). "Argyrophilic grain disease." Brain **131**(6): 1416-1432.



Fichou, Y., M. Vigers, A. K. Goring, N. A. Eschmann and S. Han (2018). "Heparin-induced tau filaments are structurally heterogeneous and differ from Alzheimer's disease filaments." Chemical Communications **54**(36): 4573-4576.

Fitzpatrick, A. W. P., B. Falcon, S. He, A. G. Murzin, G. Murshudov, H. J. Garringer, R. A. Crowther, B. Ghetti, M. Goedert and S. H. W. Scheres (2017). "Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease." Nature **547**(7662): 185-190.

Funk, K. E., S. N. Thomas, K. N. Schafer, G. L. Cooper, Z. Liao, D. J. Clark, A. J. Yang and J. Kuret (2014). "Lysine methylation is an endogenous post-translational modification of tau protein in human brain and a modulator of aggregation propensity." The Biochemical Journal **462**(1): 77-88.

Goedert, M. and R. Jakes (1990). "Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization." EMBO Journal **9**(13): 4225-4230.

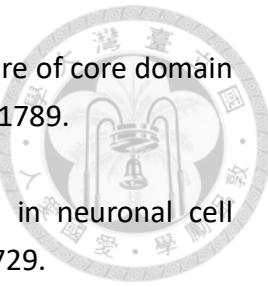
Goedert, M., R. Jakes, Z. Qi, J. H. Wang and P. Cohen (1995). "Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase." Journal of Neurochemistry **65**(6): 2804-2807.

Goedert, M., M. Spillantini and R. Crowther (1991). "Tau proteins and neurofibrillary degeneration." Brain Pathology **1**(4): 279-286.

Gong, C. X., S. Shaikh, J. Z. Wang, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbali and K. Iqbal (1995). "Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain." Journal of Neurochemistry **65**(2): 732-738.

Gorsky, M. K., S. Burnouf, J. Dols, E. Mandelkow and L. Partridge (2016). "Acetylation mimic of lysine 280 exacerbates human tau neurotoxicity in vivo." Scientific Reports **6**: 22685.

Horiguchi, T., K. Uryu, B. I. Giasson, H. Ischiropoulos, R. Lightfoot, C. Bellmann, C. Richter-Landsberg, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2003). "Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies." The American Journal of Pathology **163**(3): 1021-1031.



Inouye, H., D. Sharma, W. J. Goux and D. A. Kirschner (2006). "Structure of core domain of fibril-forming PHF/tau fragments." Biophysical Journal **90**(5): 1774-1789.

Johnson, G. V. and W. H. Stoothoff (2004). "Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction." Journal of Cell Science **117**(Pt 24): 5721-5729.

Kampers, T., P. Friedhoff, J. Biernat, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1996). "RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments." FEBS Letters **399**(3): 344-349.

Khurana, R., C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S. A. Carter, V. Krishna, R. K. Grover, R. Roy and S. Singh (2005). "Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils." Journal of Structural Biology **151**(3): 229-238.

Kolarova, M., F. Garcia-Sierra, A. Bartos, J. Ricny and D. Ripova (2012). "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease." International Journal of Alzheimer's Disease **2012**: 731526.

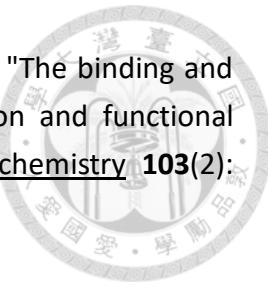
KrishnaKumar, V. G. and S. Gupta (2017). "Simplified method to obtain enhanced expression of tau protein from E. coli and one-step purification by direct boiling." Preparative Biochemistry and Biotechnology **47**(5): 530-538.

Ksiezak-Reding, H., W.-K. Liu and S.-H. Yen (1992). "Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments." Brain Research **597**(2): 209-219.

LaFerla, F. M. and S. Oddo (2005). "Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction." Trends in Molecular Medicine **11**(4): 170-176.

Lee, M. J., J. H. Lee and D. C. Rubinsztein (2013). "Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system." Progress in Neurobiology **105**: 49-59.

Li, L., A. Sengupta, N. Haque, I. Grundke-Iqbali and K. Iqbali (2004). "Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration." FEBS Letters **566**(1-3): 261-269.



Lin, Y. T., J. T. Cheng, L. C. Liang, C. Y. Ko, Y. K. Lo and P. J. Lu (2007). "The binding and phosphorylation of Thr231 is critical for tau's hyperphosphorylation and functional regulation by glycogen synthase kinase 3beta." Journal of Neurochemistry **103**(2): 802-813.

Lindwall, G. and R. D. Cole (1984). "Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly." Journal of Biological Chemistry **259**(8): 5301-5305.

Liu, F., T. Zaidi, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, R. K. Merkle and C. X. Gong (2002). "Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease." FEBS Letters **512**(1-3): 101-106.

Masters, C. L., R. Bateman, K. Blennow, C. C. Rowe, R. A. Sperling and J. L. Cummings (2015). "Alzheimer's disease." Nature Reviews Disease Primers **1**: 15056.

Mokhtar, S. H., M. M. Bakhuraysah, D. S. Cram and S. Petratos (2013). "The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton." International Journal of Alzheimer's Disease **2013**: 910502.

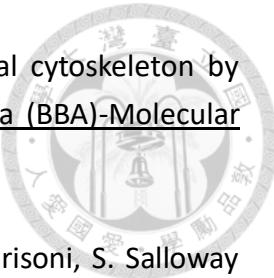
Mucke, L. (2009). "Neuroscience: Alzheimer's disease." Nature **461**(7266): 895-897.

Noble, W., E. Planel, C. Zehr, V. Olm, J. Meyerson, F. Suleman, K. Gaynor, L. Wang, J. LaFrancois, B. Feinstein, M. Burns, P. Krishnamurthy, Y. Wen, R. Bhat, J. Lewis, D. Dickson and K. Duff (2005). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(19): 6990-6995.

Perez, M., F. Hernandez, F. Lim, J. Diaz-Nido and J. Avila (2003). "Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model." Journal of Alzheimer's Disease **5**(4): 301-308.

Pierre, M. and J. Nunez (1983). "Multisite phosphorylation of τ proteins from rat brain." Biochemical and Biophysical Research Communications **115**(1): 212-219.

Rodríguez-Martín, T., I. Cuchillo-Ibáñez, W. Noble, F. Nyenya, B. H. Anderton and D. P. Hanger (2013). "Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation." Neurobiology of Aging **34**(9): 2146-2157.



Sayas, C., J. Avila and F. Wandosell (2002). "Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1582**(1-3): 144-153.

Scheltens, P., K. Blennow, M. M. B. Breteler, B. de Strooper, G. B. Frisoni, S. Salloway and W. M. Van der Flier (2016). "Alzheimer's disease." The Lancet **388**(10043): 505-517.

Schneider, A., J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (1999). "Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments." Biochemistry **38**(12): 3549-3558.

Seidler, P. M., D. R. Boyer, J. A. Rodriguez, M. R. Sawaya, D. Cascio, K. Murray, T. Gonen and D. S. Eisenberg (2018). "Structure-based inhibitors of tau aggregation." Nature Chemistry **10**(2): 170-176.

Selkoe, D. J. and M. B. Podlisny (2002). "Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease." Annual Review of Genomics and Human Genetics **3**(1): 67-99.

Sergeant, N., A. Delacourte and L. Buee (2005). "Tau protein as a differential biomarker of tauopathies." Biochimica et Biophysica Acta **1739**(2-3): 179-197.

Shahpasand, K., I. Uemura, T. Saito, T. Asano, K. Hata, K. Shibata, Y. Toyoshima, M. Hasegawa and S. Hisanaga (2012). "Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease." Journal of Neuroscience **32**(7): 2430-2441.

Shukla, V., Y. L. Zheng, S. K. Mishra, N. D. Amin, J. Steiner, P. Grant, S. Kesavapany and H. C. Pant (2013). "A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice." FASEB Journal **27**(1): 174-186.

Sievers, S. A., J. Karanicolas, H. W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J. T. Stevens, J. Munch, D. Baker and D. Eisenberg (2011). "Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation." Nature **475**(7354): 96-100.



Simic, G., M. Babic Leko, S. Wray, C. Harrington, I. Delalle, N. Jovanov-Milosevic, D. Bazadona, L. Buee, R. de Silva, G. Di Giovanni, C. Wischik and P. R. Hof (2016). "Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies." Biomolecules **6**(1): 6.

Skrabana, R., J. Sevcik and M. Novak (2006). "Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis." Cellular and Molecular Neurobiology **26**(7-8): 1085-1097.

Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmeichel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen and A. D. Roses (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(5): 1977-1981.

Sui, D., X. Xu, X. Ye, M. Liu, M. Mianecki, C. Rattanasinchai, C. Buehl, X. Deng and M.-H. Kuo (2015). "Protein interaction module-assisted function X (PIMAX) approach to producing challenging proteins including hyperphosphorylated tau and active CDK5/p25 kinase complex." Molecular & Cellular Proteomics: MCP **14**(1): 251-262.

Thomas, S. N., K. E. Funk, Y. Wan, Z. Liao, P. Davies, J. Kuret and A. J. Yang (2012). "Dual modification of Alzheimer's disease PHF-tau protein by lysine methylation and ubiquitylation: a mass spectrometry approach." Acta Neuropathologica **123**(1): 105-117.

Walker, L. C., M. I. Diamond, K. E. Duff and B. T. Hyman (2013). "Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases." JAMA Neurology **70**(3): 304-310.

Wang, C. K., S. E. Northfield, Y. H. Huang, M. C. Ramos and D. J. Craik (2016). "Inhibition of tau aggregation using a naturally-occurring cyclic peptide scaffold." European Journal of Medicinal Chemistry **109**: 342-349.

Zhang, W., B. Falcon, A. G. Murzin, J. Fan, R. A. Crowther, M. Goedert and S. H. Scheres (2019). "Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases." eLife **8**: e43584.

Zheng, J., C. Liu, M. R. Sawaya, B. Vadla, S. Khan, R. J. Woods, D. Eisenberg, W. J. Goux and J. S. Nowick (2011). "Macro cyclic β -sheet peptides that inhibit the aggregation of a tau-protein-derived hexapeptide." Journal of the American Chemical Society **133**(9): 3144-3157.

