

研究主題:Study of protein structural dynamics by computer simulation  
(conformational changes, protein misfolding, protein folding, protein aggregation...)

指導教授:王勝仕

研究團隊:生物分子工程實驗室

申請人:林耿琦

## 第一章 緒論

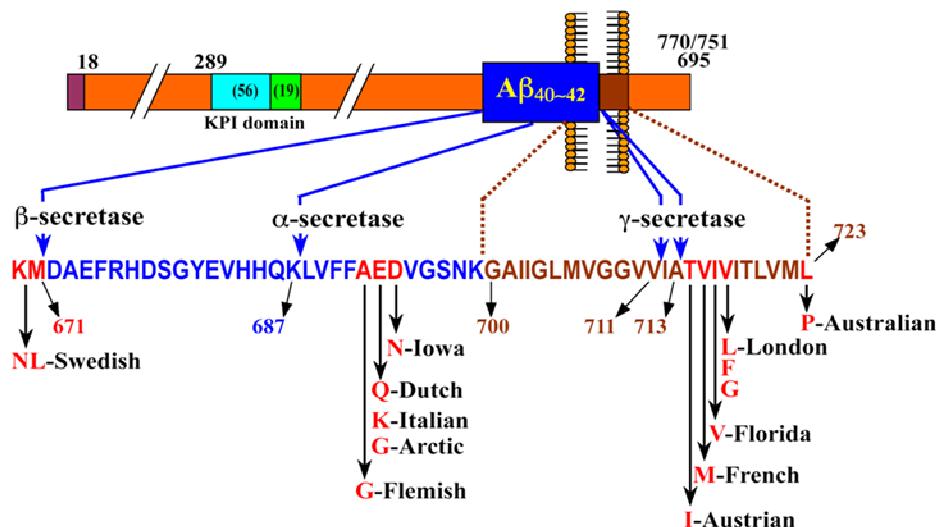
阿滋海默症(Alzheimer's disease)，又稱老人失智症。此症為一種漸進性神經系統退化的疾病，也是目前最主要造成失智症的疾病，罹患此症的病人主要的症狀有記憶、認知、及語言功能的減退，方向感的迷失及出現習慣性的動作等…，最後因無法照顧自己常伴隨著其他疾病而死亡。老化為造成阿滋海默症的主要危險因子之一，依據發病的年齡，可分為早發性及晚發性兩種，一般以 65 歲作區別。另外以遺傳作為區別，阿滋海默症可分為家族性(familial)及偶發(sporadic)，目前已知家族性阿滋海默患者皆為早發性。

阿滋海默症患者腦部的病理切片有兩大特徵，一是於大腦皮質(cerebral cortex)、海馬迴(hippocampus)、杏桃體(amygdale)及大腦與認知功能區相關區域發現老化斑塊(senile plaques)(Glenner and Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985)，另一特徵則是神經細胞微纖維糾結(neurofibrillary tangles)，斑塊最主要的成份是  $\beta$ -類澱粉勝肽( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ )。A $\beta$  為 39-43 個胺基酸所組成的勝肽，它是由一種穿膜蛋白  $\beta$ -類澱粉前趨蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein; APP)在其正常代謝過程中之產物，是一種可溶的勝肽(Nunan *et al.*, 2000)。APP 有五種異構物分別為 APP563、APP695、APP714、APP751 及 APP770，在人類的腦中主要是 APP695 及 APP714 這兩種型態(Ashall *et al.*, 1994)。

APP 代謝的路徑有兩種，一種是 APP 先由  $\beta$ -secretase 在如下圖胺基酸第 596、597 的位置切出 N 端的  $\beta$ APPs 和 C 端的 C99，在膜內再經由  $\gamma$ -secretase 切出 A $\beta$ ，此為  $\beta$ -pathway。另一路徑則是  $\alpha$ -pathway:先由  $\alpha$ -secretase 在胺基酸第 612、613 的位置切割，在膜內再經由  $\gamma$ -secretase 切出一段比 A $\beta$  短的小勝肽

P3(Haass *et al.*, 1993)。

### Amyloid Precursor Protein (APP)



Modified from Nilsberth *et al.* *Nat. Neurosci.* 4, 887-893 (2001).

上圖紅色的字母代表目前知道的家族性遺傳的基因突變點，A<sub>β</sub> 的 N 端和 C 端附近的突變點會分別影響 β-secretase 及 γ-secretase 切割 APP 的效能，而 A<sub>β</sub> 氨基酸第 A21、E22、D23 位置的突變則可能會影響 A<sub>β</sub> 的起始結構或被切出後聚集的速率。

一般認為 A<sub>β</sub> 在聚集過程中其構形會改變，若能獲得 A<sub>β</sub> 在聚集過程中之結構資訊，將有助於我們從結構的角度探討 A<sub>β</sub> 聚集的分子機制。目前實驗的方法例如核磁共振光譜學(NMR spectroscopy)、X-ray 結晶學(X-ray crystallography)、電子顯微鏡(Electron microscopy)等實驗技術來獲得 A<sub>β</sub> 在聚集(aggregation)過程中其動態結構變化的完整資訊。由於目前從實驗上仍然無法看到 A<sub>β</sub> 的起始結構資訊，而在細胞膜的環境下，實驗也只看到最後在細胞表面現在纖維(Eva *et al.*, 2008)。但礙於實驗的難度，我們打算以分子動力學模擬的方式來加以探討。

## 第二章 研究方法

### 2.1 分子動態模擬系統的建立

從文獻上可知 A $\beta$ <sub>40</sub> 在 SDS(sodium dodecyl sulfate) 溶液中之結構已經由實驗證明其胺基酸 1-14 為不定型結構，15-35 是  $\alpha$  螺旋結構(Coles *et al.*, 1998)，PDB 碼為 1BA4。也有文獻已經利用分子動態模擬的方式針對 A $\beta$ <sub>40</sub> 在細胞膜環境下進行模擬，發現 A $\beta$ <sub>40</sub> 大部分是  $\alpha$  螺旋狀結構，且從一開始在細胞膜中最後浮在細胞膜表面(Xu *et al.*, 2004)，從此結果與實驗對照可推測 A $\beta$ <sub>40</sub> 在細胞膜中是非常不穩定的，因此無論利用實驗的方法或分子動態模擬都很難獲得 A $\beta$ <sub>40</sub> 起始結構資訊。於是我們更進一步嘗試 APP protein 經  $\beta$ -secretase 切割後尚未進行  $\gamma$ -secretase 切割時之結構模型，長度為 60 個胺基酸，進行分子動態模擬，希望能獲得其在細胞膜環境中之起始結構資訊，藉此來探討 A $\beta$  聚集的分子機制。

建構整個分子動態模擬初始系統所使用之軟體為 Discovery studio，首先我們利用 Discovery studio 軟體建立 A $\beta$ <sub>60</sub> peptide 初始結構模擬，參考 A $\beta$ <sub>40</sub> 在 SDS(sodium dodecyl sulfate) 溶液中之結構，我們將胺基酸 1-14 設定為不定型，15-60 設定為  $\alpha$  螺旋結構。

細胞膜是由許多不同的脂質分子所組成的，而腦神經細胞膜最主要的是由 DMPC(Dimyristoylphosphatidylcholine) 所構成的，因此我們以 DMPC 脂質分子作為模擬用的細胞膜環境。從文獻上可獲得以 DMPC 分子建構完成之細胞膜模型 dmpe\_128\_20ns.pdb(Andrey *et al.*, 2004)，我們以此作為細胞膜的起始結構模型。接著刪除與 A $\beta$ <sub>60</sub> 分子重疊或距離小於 1.3 $\text{\AA}$  的 DMPC 分子，其餘超過 1.3 $\text{\AA}$  的 DMPC 則以能量最佳化(Energy minimization)調整至適當的位置。系統的 pH 值為 7，且所有的胺基酸分子都是在 pH 值為 7 的狀態下產生。整個系統的大小邊長 65 $\text{\AA}$ (x)、65 $\text{\AA}$ (y)、90 $\text{\AA}$ (z) 之長方體。使用軟體將系統加入 SPC(simple point charge) 模擬水分子，刪除細胞膜內的水分子，必要時加入離子使整個系統達電中性，再將系統做一次能量最佳化，即完成一開始系統建立。圖 1 為 A $\beta$ <sub>60</sub> 與 DMPC 起始

結構圖。

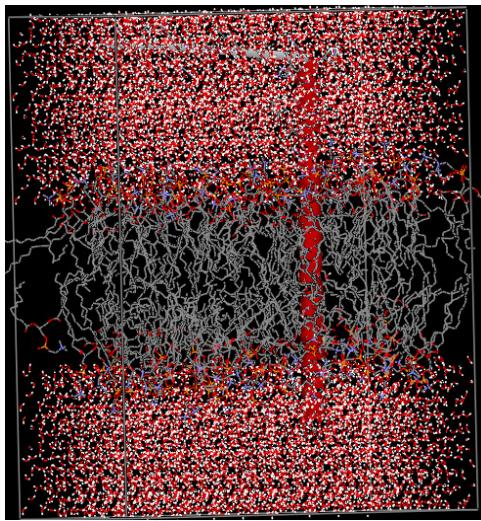


圖 1 模擬系統示意圖

## 2.2 分子動態模擬

分子動態模擬環境為定壓、定溫、以及定分子(NPT)和週期性的邊界條件(periodic boundary condition)(如圖 2)來進行。固定壓力為 1bar。利用 PME(Particle-Mesh Ewald)演算法(如 1-1)做電子作用力的計算(Darden *et al.*, 1993; Essmann *et al.*, 1995)。以 Lincs(linear constraint solver)方法來做所有原子間的鍵長修正(Hess *et al.*, 1997)。

$$V(r) = f \frac{\operatorname{erfc}(\beta r_{ij})}{r_{ij}} q_i q_j \quad (1-1)$$

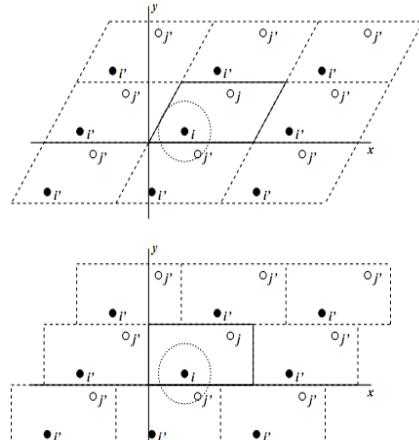


圖 2 二維空間下週期性邊界條件

對於系統內 N 個相互作用的原子其使用的數學方程式以 1-2 來表示，且其作用力為 potential function V 的負微分( $r_1, r_2, \dots, r_N$ ) $(1-3)$ 。

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, i = 1 \dots N \quad (1-2)$$

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (1-3)$$

分子動態模擬的基礎單位(basic units)及推導衍生性單位(derived units)列舉在

table 1.1 及 table 1.2

Quantity	Symbol	Unit
length	r	nm= $10^{-9}$ m
mass	m	u (atomic mass unit) = $1.6605402(10) \times 10^{-27}$ kg (1/12 the mass of a $^{12}\text{C}$ atom) $1.6605402(10) \times 10^{-27}$ kg
time	t	ps= $10^{-12}$ s
charge	q	e = electronic charge = $1.60217733(49) \times 10^{-19}$ C
temperature	T	K

Table 1.1 Basic units used in MD

Quantity	Symbol	Unit
energy	E, V	kJ mol <sup>-1</sup>
force	F	kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-1</sup>
pressure	p	kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-3</sup> = $1030/N_{AV}$ Pa $1.660\ 54 \times 10^6$ Pa = 16.6054 Bar
velocity	v	nm ps <sup>-1</sup> = 1000 m/s
dipole moment	$\mu$	e nm
electric potential	$\Phi$	kJ mol <sup>-1</sup> e <sup>-1</sup> = 0.010 364 272(3) Volt
electric field	E	kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-1</sup> e <sup>-1</sup> = $1.036\ 427\ 2(3) \times 10^7$ V/m

Table 1.2 Derived units

## 2.3 分子動態模擬的演算流程

以下為分子動態模擬的演算流程圖

### The global MD algorithm

#### 1. Input initial conditions

Potential interaction V as a function of atom positions

Positions  $r$  of all atoms in the system

Velocities  $v$  of all atoms in the system



Repeat 2,3,4 for the required number of steps:

#### 2. Compute forces

The force on any atom

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}$$

Is computed by calculating the force between non-bonded atom pairs:

$$\mathbf{F}_i = \sum_j \mathbf{F}_{ij}$$

plus the forces due to bonded interactions (which may depend on 1, 2, 3, or 4 atoms), plus restraining and/or external forces. The potential and kinetic energies and the pressure tensor are

computed.



#### 3. Update configuration

The movement of the atoms is simulated by numerically solving Newton's equations of motion

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$$



#### 4. If required: Output step write positions, velocities, energies, temperature, pressure, etc.

### 第三章 結果分析與探討

3.1 模擬的 model 及條件如下表：

Model	peptide	Temp.(K)	# of DMPC	# of H <sub>2</sub> O	Ions	Time(ns)
M1	Ab <sub>60</sub> (wild type)	310	118	8150	CL-	10ns
M2	Ab <sub>60</sub> (E22G)	323	123	8241	CL-	10ns

#### 3.2 數據分析

首先將分子動態模擬過程中所紀錄之運動路徑座標做前處理，利用 DSSP(Dictionary of Protein Secondary Structure) 程式計算出每一時間點下每個胺基酸的二級結構狀態及其 phi 與 psi 角，並以圖表的形式呈現二級結構與時間演化圖。如圖 3(wild-type)、圖 4(E22G)。

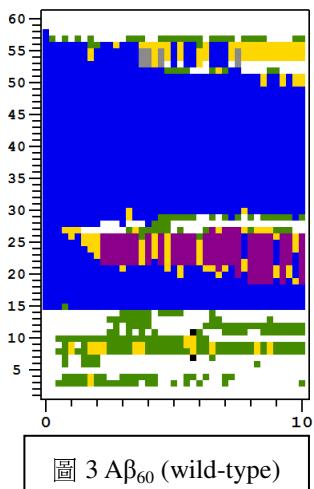


圖 3 Aβ<sub>60</sub> (wild-type)

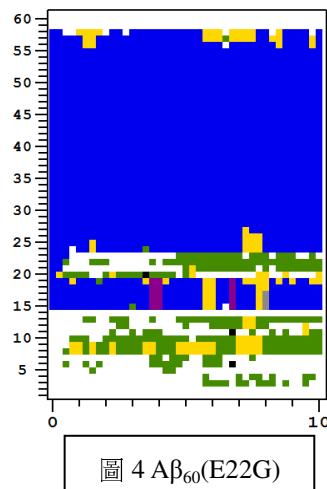
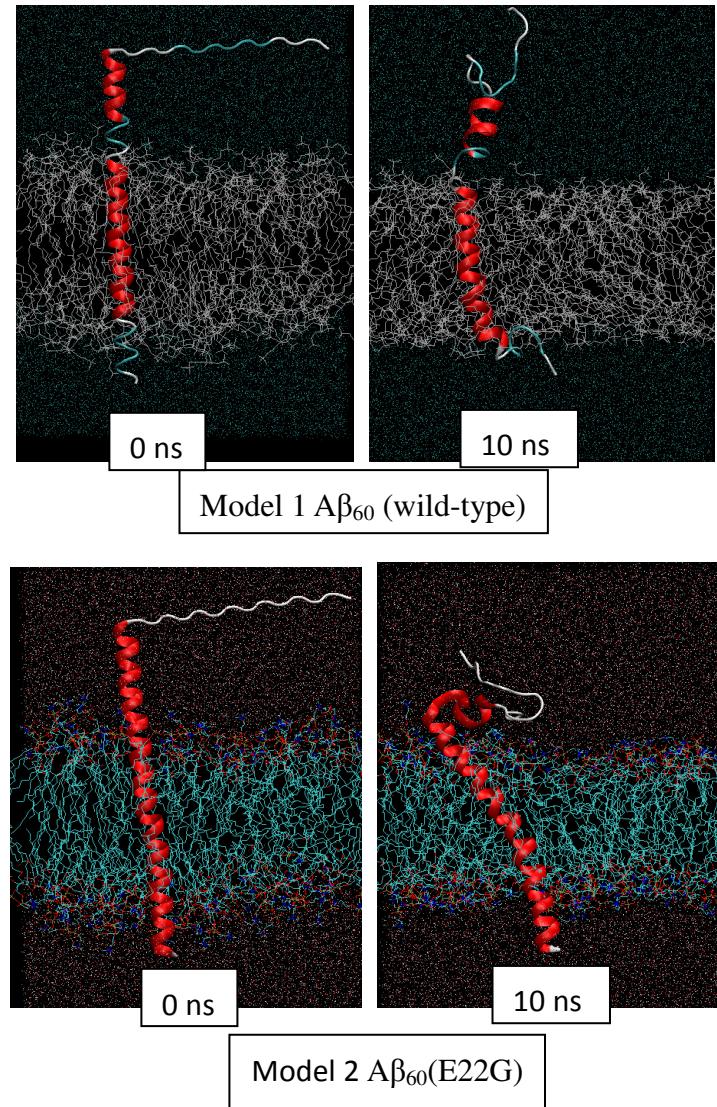


圖 4 Aβ<sub>60</sub>(E22G)

表為 DSSP 二級結構資訊在二級結構時間演化圖中所使用之顏色：

DSSP 代碼	H	B	E	G	I	T	S
意義	α-helix	單獨的 β-bridge	β-strand 的 一部分	3 <sub>10</sub> -helix	5-helix	H-bonded turn	bend
顏色	藍	黑	紅	灰	紫	黃	綠

從 DSSP 我們可以看出  $\text{A}\beta_{60}$  (wild-type) 與  $\text{A}\beta_{60}(\text{E}22\text{G})$  在 10ns 下二級結構的變化，我們可以看出 wild-type 在 10ns 期間，位於 DMPC bilayer 間之殘基(G29-K50)都維持著  $\alpha$ -helix 構形，然而  $\text{A}\beta_{60}(\text{E}22\text{G})$  在 1ns 之後，其殘基(F20-G25)已經去折疊形成 random coil 或 bend 的構形。圖 5、圖 6 為  $\text{A}\beta_{60}$  (wild-type) 與  $\text{A}\beta_{60}(\text{E}22\text{G})$  模擬過程中第 0 ns、10 ns 的結構快照圖(snapshot)。



#### 第四章 結論

目前對 A $\beta$  凝集的分子機制仍不甚了解，從結構觀點，認為 A $\beta$  凝集成纖維之過程與其結構改變及其分子間之交互作用有關。本研究利用分子模擬計算 A $\beta$  之起始結構，目的是從結構的觀點探討 A $\beta$  凝集的分子機制。本研究只對 A $\beta$  單一分子做模擬，因此只能獲得 A $\beta$  在凝集過程初期，其本身結構改變之資訊，而無法得知 A $\beta$  分子間的交互作用，要更進一步了解 A $\beta$  凝集的分子機制，則需探討 A $\beta$  分子間的交互作用機制，這是我們即將更進一步研究的議題。