

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：化合物靶向 α -synuclein 蛋白聚集体的研究

姓 名：徐浩翔 学 号：20307110117

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学（强基计划）

指导教师：鲁伯坝 职 称：研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期： 2024 年 5 月 16 日

化合物靶向 α -synuclein 蛋白聚集体的研究

完成人

徐浩翔

指导小组成员

鲁伯垚 教授

王晴 博士

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景	1
1.2 立题依据	3
1.3 主要研究内容	4
二、材料与amp;方法	5
2.1 实验材料	5
2.1.1 细胞系	5
2.1.2 载体与宿主菌	5
2.2 试剂	5
2.2.1 细胞系传代培养	5
2.2.2 细胞转染	6
2.2.3 Western Blot 免疫印迹	6
2.2.4 免疫荧光染色	7
2.3 实验仪器	7
2.4 实验软件	7
2.5 实验方法	8
2.5.1 细胞聚集体模型的诱导与药效实验	8
2.5.2 检测 α -synuclein 聚集体信号	8

2.5.3 小分子与蛋白结合实验	9
2.5.4 分子对接	10
2.5.5 疾病型小鼠造模、行为学实验与脑组织分析	10
三、研究结果.....	14
3.1 体外初步筛选特异性靶向 α -synuclein 聚集体的小分子化合物.....	14
3.2 过表达人源 α -synuclein 的 PC12 细胞株的构建.....	14
3.3 搭建 PFFs 诱导细胞形成可检测聚集体信号的实验方法.....	14
3.4 通过 HTRF 实验初步评价初筛化合物药物效果, 313-4 化合物在候选化合物中有着最好的降解聚集体信号的效果.....	15
3.5 313-4 的药物效果呈浓度依赖性, 并且在功能上挽救细胞凋亡	16
3.6 313-4 通过自噬依赖的途径降解 α -synuclein 聚集体	17
3.7 313-4 体外实验验证与 LC3 蛋白以及 α -synuclein 聚集体的结合	18
3.9 313-4 和 LC3 与 α -synuclein 聚集体的结合位点预测	19
3.10 α -synuclein 聚集体疾病型小鼠模型造模显示差异性.....	19
四、讨 论.....	22
4.1 实验结果回顾与讨论.....	22
4.2 PFFs 提供的聚集体本底信号问题.....	22
4.3 化合物药效实验遇到的问题.....	23
4.4 p-syn 信号与聚集体信号不同步问题.....	24
4.5 小鼠脑组织聚集体信号检测难题.....	24
参考文献.....	26
致 谢.....	28

摘要

神经退行性疾病 (Neurodegenerative diseases, NDDs) 是一类以神经元不可逆丧失为特征性疾病, 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 作为第二大 NDD, 其主要病理特征为 α -synuclein 蛋白异常聚集形成的路易体和多巴胺能神经元的丢失。 α -synuclein 的异常聚集被认为是 PD 的关键病理特征。本研究旨在寻找能够特异性降解 α -synuclein 聚集体的小分子化合物。我们构建了过表达人源 α -synuclein 的 PC12 细胞株, 并建立了利用聚集体 (α -syn preformed fibrils, PFFs) 诱导细胞形成聚集体, 采用 HTRF、Western Blot 等手段检测聚集体信号的实验方法。基于芯片筛选, 我们得到了一批特异性靶向 α -synuclein 聚集体的小分子并在细胞模型中进行药效评价, 化合物 313-4 展现出良好的降低 α -synuclein 聚集体信号的效果, 并具有浓度依赖性。我们推测 313-4 有可能通过结合 α -synuclein 聚集体影响其互作蛋白的方式, 从而影响其稳定性。通过加入自噬阻断剂 CQ 与 NH_4Cl , 我们发现 313-4 以自噬依赖的方式降低 α -synuclein 聚集体水平。基于 MST、SPR、CETSA 等体外结合实验的数据, 证明了 313-4 体外分别与 LC3、 α -synuclein 结合, 表明 313-4 有可能通过 ATTEC 的方式降解 α -synuclein 聚集体。利用脑定位注射, 我们构建了一批诱导人源化 α -synuclein 蛋白聚集体的小鼠模型, 并通过小鼠行为学实验与脑组织切片染色实验证明了其 PD 表型。本研究不仅为 PD 治疗提供了潜在的小分子化合物 313-4, 而且构建了一种新的 PD 动物模型, 为 PD 及其他共核蛋白病的治疗提供了新的思路和策略。

关键词: 神经退行性疾病, 帕金森病, α -synuclein, 聚集体降解

Abstract

Neurodegenerative diseases (NDDs) are characterized by the irreversible loss of neurons, with Parkinson's disease (PD) being the second most common NDD. The primary pathological features of PD include the formation of Lewy bodies due to abnormal aggregation of α -synuclein protein and the degeneration of dopaminergic neurons. The abnormal aggregation of α -synuclein is considered a key pathological characteristic of PD. This study aimed to identify small molecules capable of specifically degrading α -synuclein aggregates. We constructed a PC12 cell line overexpressing human α -synuclein and established an experimental method for inducing cellular aggregate formation using α -synuclein preformed fibrils (PFFs), with aggregate signals detected using Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) and Western Blot. Based on chip screening, we obtained a series of small molecules that specifically target α -synuclein aggregates and evaluated their efficacy in cellular models. Compound 313-4 showed a potent effect in reducing α -synuclein aggregate signals and demonstrated concentration-dependent activity. We hypothesize that 313-4 may affect the stability of α -synuclein aggregates by binding to them and influencing the interaction with their associated proteins. The addition of autophagy inhibitors, Chloroquine (CQ) and NH₄Cl, revealed that 313-4 reduces α -synuclein aggregate levels in an autophagy-dependent manner. Data from in vitro binding assays, including MicroScale Thermophoresis (MST), Surface Plasmon Resonance (SPR), and Cellular Thermal Shift Assay (CETSA), confirmed the interaction of 313-4 with both LC3 and α -synuclein, suggesting that 313-4 may degrade α -synuclein aggregates through an Autophagy-Tethering Compound (ATTEC) mechanism. Using stereotactic injection, we developed a mouse model inducing the aggregation of human α -synuclein protein, which was validated by behavioral experiments and brain tissue section staining, exhibiting PD phenotypes. This study not only provides a potential small molecule compound 313-4 for PD treatment but also establishes a novel PD animal model,

offering new perspectives and strategies for the treatment of PD and other synucleinopathies.

Key words: NDDs, PD, α -synuclein, aggregate degradation

一、前言

1.1 研究背景

神经退行性疾病（Neurodegenerative diseases, NDDs）是一组影响中枢神经系统或周围神经系统的神经性疾病。这些疾病的特征是神经元（大脑和脊髓中的神经细胞）的不可逆丧失。NDDs 的进展会导致神经网络结构和功能的崩溃，进而影响到记忆、认知、行为、感觉和/或运动功能。NDDs 通常包含了以下八种特征：病理性蛋白聚集、突触和神经网络功能障碍、异常的蛋白稳态、细胞骨架异常、能量稳态的改变、DNA 和 RNA 缺陷、炎症、神经元细胞死亡^[1]。其中病理性蛋白聚集体被认为是许多 NDDs 关键的病理特征与致病因素。帕金森病（Parkinson's disease, PD）、路易体痴呆（Lewy Body dementia, LBD）、多系统萎缩（Multiple system atrophy, MSA）等 NDDs 以细胞内出现以 α -synuclein 蛋白异常聚集为主要成分的纤维样包涵体为特征，被统称为共核蛋白病（synucleinopathies）^[2]。

PD 作为世界上第二大神经退行性疾病，它的症状主要包括震颤、肌肉僵直、运动迟缓等运动症状；以及嗅觉障碍、自主神经系统功能障碍等非运动症状。PD 的两个主要病理特征是由于 α -synuclein 蛋白异常折叠导致的路易体（Lewy body）或路易突触的累积以及黑质致密部多巴胺能神经元的丢失^[3]。

α -synuclein 是一种在中枢神经系统丰富表达的蛋白质，由 140 个氨基酸组成，分子量约为 14kDa，最先于 1997 年在帕金森病患者脑组织的路易小体中被 Spillantini 等观察到^[4]。同年，Polymeropoulos 等证实了编码 α -synuclein 的基因 SNCA 发生点突变以及基因重复与帕金森病的发展密切相关^[5]。它具有一个亲脂性的、富含赖氨酸的氨基末端，以及一个无序的、酸性的羧基末端尾。 α -synuclein 的中心区域包含一个高度疏水的序列，称为非淀粉样 β 成分

（NAC）。 α -synuclein 主要位于突触前末端，与突触囊泡相关联，可能在调节神经递质释放、突触功能和可塑性中发挥作用，与突触囊泡的运输和再填充有关，可能控制着从储备池到突触囊泡释放位点的囊泡运输^[5]。同时， α -synuclein 可能作为 SNARE 蛋白复合物的非经典分子伴侣，通过控制其降解和影响其组

装、维持和分布来发挥作用^[6]。

α -synuclein 在细胞质中主要以无序单体的形式存在，当与膜结合，其 N-末端的区域可以形成 α -螺旋结构。在病理条件下， α -synuclein 可以转变为富含 β -折叠的结构，进而从单体转变为寡聚体和纤维聚集体。越来越多的证据表明，聚集体的 α -synuclein 在疾病进展中扮演重要的角色^[7-10]。

目前，PD 的临床治疗方案主要包括药物治疗、手术治疗和行为疗法。药物治疗中，多巴胺能药物左旋多巴（levodopa）、多巴胺受体激动剂（dopamine receptor activators, DAs）、单胺氧化酶 B 型抑制剂（MAO-B inhibitors）等被认为是治疗的“黄金标准”，对特发性帕金森病有较高的反应率，但随着病情进展，患者通常需要逐渐增加多巴胺能药物的剂量，只能对症治疗缓解行为症状，并不能阻止疾病的进一步恶化。手术治疗方法如脑深部电刺激（deep brain stimulation, DBS）效果持久，但是最具侵入性。行为疗法如职业治疗、言语治疗和认知行为疗法等提供了非药物替代方案，可以单独应用或与药物治疗结合使用，有助于治疗帕金森病患者的个体症状。然而目前临床上仍缺乏根本性干预手段，特别是小分子药物，所以找到有效的药物依然是一项很严峻的挑战。

α -syn 在 PD 及其他突触核蛋白病的发病中扮演着核心角色，靶向 α -syn 的治疗手段包括免疫疗法、降低 α -syn 蛋白表达、抑制其聚集、增强其清除和降解，以及针对其他相关基因/蛋白的干预。目前，这些治疗策略中的一部分已经进入临床试验阶段，展现了初步的疗效和安全性。临床上正在推进的一些治疗方案包括：大分子免疫疗法，如使用 AFFITOPE PD01A 和 PD03A 疫苗以及单克隆抗体 prasinezumab^[11-12]。降低 α -syn 表达的方法包括使用小分子药物如 β 2-肾上腺素受体激动剂，以及生物制剂 SLS-004 和 ST-502^[13]。抑制 α -syn 的聚集如 Anle138b、通过增强自噬（如使用雷帕霉素）或泛素-蛋白酶系统来提高 α -syn 的清除和降解也是研究的重点。此外，针对其他与 PD 相关的基因/蛋白，如葡萄糖脑苷脂酶（GCase）的激活剂 ambroxol 和 LTI-291，以及 LRRK2 的抑制剂 DNL151 和 DNL201，也在临床研究中^[14-17]。

然而 PD 的复杂性和异质性、缺乏可靠的生物标志物和药物递送挑战，凸显了研究和开发新型小分子治疗药物的必要性。相较于单克隆抗体，小分子药物有着更小的分子量，意味着更好的跨膜能力以及穿过血脑屏障（blood-brain

barrier, BBB) 的能力, 同时小分子更多元的给药方式 (如片剂口服) 以及低廉的价格也是单克隆抗体所无法比拟的优势。小分子药物的开发不仅为 PD 治疗提供了多样化的选择, 还可能针对疾病的多个病理环节, 通过组合疗法发挥协同效应, 从而更有效地减缓或阻止疾病的进展, 也为未来个性化医疗和组合疗法的发展奠定了基础。

1.2 立题依据

自噬 (autophagy) 是在真核生物内高度保守的一种胞内降解机制, 自噬的过程从吞噬泡的起始、成核、吞噬泡的扩张、闭合直到最终双层膜自噬泡 (autophagosomes) 形成。形成双层膜结构的自噬泡包裹着需要降解的细胞物质, 并将它们运送至溶酶体进行分解。在这个过程中, 涉及了大量的自噬相关蛋白 (autophagy-related proteins, ATG), 其中 LC3 (微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3) 蛋白是自噬泡形成的关键蛋白之一, 它通过脂化修饰 (lipidation) 与自噬泡膜结合, 标记自噬泡并促进其与溶酶体的融合。在这个过程中, LC3 蛋白始终连接在膜上, 在生理的自噬过程中, 自噬受体携带待降解的货物, 通过与 LC3 连接锚定在自噬泡中。

基于 LC3 在细胞自噬中所发挥的作用, ATTEC (AuTophay-Tethering Compounds) 小分子的设想被提出来^[18]。ATTECs 是一类设计巧妙的小分子化合物, 它假定存在一种化合物可以同时与 LC3 蛋白和待降解的物质相连, 通过与 LC3 蛋白的特定结构域结合, 选择性地将目标蛋白或细胞器标记为自噬降解的货物。例如, 目前已经验证的 ATTECs 可以靶向包括致病性多聚谷氨酰胺 (polyQ) 蛋白、肿瘤蛋白 (如 BRD4、NAMPT、CDK9/cyclin T1 复合体) 以及脂滴等细胞器^[18-22]。

PROTACs 同样是一种革命性的小分子药物设计策略, 它们通过促进目标蛋白与 E3 泛素连接酶的结合, 促使目标蛋白的泛素化和随后的蛋白酶体降解。然而, PROTACs 的作用依赖于目标蛋白上可接近的赖氨酸残基, 这限制了它们对“不可药物化”目标的适用性。相比之下, ATTECs 不依赖于目标蛋白的特定氨基酸残基, 而是通过 LC3 这一自噬通路的通用标记来进行靶向。这种策略为降解那些传统上难以成药的蛋白质提供了新的可能性, 例如通过 ATTECs 降解导致亨廷顿病的突变型亨廷顿蛋白 (mHTT)。这一策略的潜力在于其广泛的适用性, 可

以针对多种疾病相关的蛋白质和细胞器,为未来的药物开发提供了一个充满希望的新方向。

1.3 主要研究内容

我们将基于 ATTEC 技术,寻找和 α -synuclein 聚集体结合的候选化合物,从而实现特异性地促进 α -synuclein 聚集体的降解,为共核蛋白病的治疗寻找新的候选化合物。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞系

- a) PC12-syn-flag: 稳转带 flag 标签的人源 α -synuclein 的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞
- b) PC12-空-flag
- c) HEK-293T-syn-flag: 稳转带 flag 标签的人源 α -synuclein 的人胚肾细胞
- d) HEK-293T-空-flag
- e) LC3B knockout HEK-293T-syn-flag
- f) ATG5 knockout HEK-293T-syn-flag 细胞

2.1.2 载体与宿主菌

- a) DH5 α 感受态细胞

2.2 试剂

2.2.1 细胞系传代培养

- a) 细胞培养基

表 1 各细胞系培养基

适用细胞	基础培养基	添加剂
PC12-syn-flag、 PC12-空-flag	DMEM 细胞培养基 (1 \times), Thermo Fisher Scientific [®] Gibco [™] Lot: 2186828	5% (体积比) FBS 胎牛血清, Thermo Fisher Scientific [®] Gibco [™] Lot: 10099141C; 10% (体积比) Horse Serum 马血清, Thermo Fisher Scientific [®] Gibco [™] Lot: 16050122
wt/ATG5KO/LC3BKO HEK-	DMEM 细胞培养基 (1 \times),	10% (体积比) FBS 胎牛血清

293T-syn-flag、HEK-293T- 空-flag	Thermo Fisher Scientific® Gibco™ Lot: 2186828	清, Thermo Fisher Scientific® Gibco™ Lot: 10099141C
-----------------------------------	--	--

- b) TrypLE™ Express 溶液, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot:2187241
- c) 1×PBS, Cytiva®,Lot:SH30256.01;
- d) DMSO 二甲亚砜, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 85190
- e) 台盼蓝染色剂 (0.4%), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: T1028

2.2.2 细胞转染

- a) Opti-MEM 溶液 (1×) , Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot:2120763
- b) FuGENE® HD 转染试剂, Promega® E231A

2.2.3 Western Blot 免疫印迹

- a) NP-40 裂解液, Beyotime® Ref: P0013F 添加剂: Complete Tablets Cocktail 蛋白酶抑制剂, Roche® Ref: 04693132001; 磷酸酶抑制剂混合物 A (50×), Beyotime®P1082
- b) Bradford 蛋白浓度测定试剂盒: Beyotime® P0006
- c) LDS Sample Loading Buffer (4×), Novex® Lot:2201445
- d) SDS-PAGE 电泳 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%), 雅酶® cat. no. PG113; SurePAGE™, Bis-Tris, 10×8, 4-12%, 15 wells, GenScript Lot: M00654 Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液 (10×), 雅酶® cat. no.PS105, Lot:03511040
- e) 转膜 Immun-Blot® PVDF membranes for protein blotting, BIO-RAD® CAT: #1620177; iBlot®2 NC Regular Stacks, Invitrogen® Lot: 2NR241220-01 转膜缓冲液 (10×), 雅酶® CAT:PS109, Lot:034A1040
- f) 封闭 Non-Fat Powdered Milk, Sangon Biotech® Lot: GB02BA0003 ; QuickBlock™ Western 封闭液, Beyotime® P0252-100ml
- g) 一抗
 - i. LC3B (1:1200), Thermo Fisher Scientific, cat. no. PA1-16930;
 - ii. αsyn (1:1500), BD, cat. no.610787
 - iii. FLAG 抗体,Thermo Fisher Scientific,cat.no.MA1-91878

- iv. anti- β -tubulin antibody (1:2000), Abcam® Lot: ab6046
- h) 二抗
 - i. Goat-anti-mouse IgG-HRP 2nd antibody (1:5000), Abmart® Lot:324379
 - ii. Goat-anti-rabbit IgG-HRP 2nd antibody (1:5000), Abmart® Lot:3246747
- i) 通用型 ECL 发光底物, 圣尔生物® Lot:MN11
- j) TBS/Tween 缓冲液 (10 \times), 雅酶® CAT:PS103 2.2.4
- k) 均相时间分辨荧光技术 (HTRF)
 - i. 抗体 Alpha-Synuclein aggregation Kit HTRF®, Cis-bio®, cat. no. 6FASYPEG

2.2.4 免疫荧光染色

- a) 可溶性聚四氟乙烯 PFA, Sigma-Aldrich®, cat. no. 430943 使用 ddH₂O 稀释至 4%使用。
- b) DAPI 核酸染料, Thermo Fisher® Scientific®, Lot: D1306;
- c) 抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI), Beyotime® P 0131-25ml.

2.3 实验仪器

- a) Countess™ 3 自动细胞计数器, Thermo Fisher® Scientific®, Lot: AMQAX2000
- b) BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪
- c) PowerPac™ 通用电泳仪电源
- d) E-BLOT®接触式化学发光电子压片成像仪
- e) 显微镜 ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜 ZEISS AxioScope 5 智能显微镜高内涵成像系统

2.4 实验软件

- a) Excel
- b) Image J 1.54i
- c) GraphPad Prism 10.1.2
- d) OlyVIA 4.1.1
- e) R studio 4.3.1

2.5 实验方法

2.5.1 细胞聚集体模型的诱导与药效实验

A) 细胞的培养

本研究所有细胞培养于 37°C、5% CO₂ 的培养环境。96 孔板的种板密度为 1×10⁵ 个/mL。其他孔板的种板密度为 1.5 或 2×10⁵ 个/mL。对于免疫荧光实验，种板密度为 1×10⁵ 个/mL。

B) PFFs 的制备

PFFs 的制备依照 Virginia 课题组提供的步骤^[23]，纯化的 α -synuclein 单体蛋白 (200 μ M) 置于金属浴连续振荡 5 天形成纤维聚集体。聚集体利用超声装置以 25% 功率超声 10s，超声两轮后成为便于转染进入细胞的 PFFs 短片段。后续用于细胞实验的 PFFs 置于紫外照射 30min。分装储存于 -80°C 冰箱，每次实验时取分装后的小体积 PFFs，避免反复冻融。

C) PFFs 诱导细胞形成聚集体实验

借助 FuGENE[®]HD 转染试剂将 PFF 转入细胞内，在细胞转染以前，先将正常培养基换成 Opti-MEM[™] 减血清培养基以提高转染效率，置换培养液四个小时后，向细胞中加入 1:1:5 配比的 PFFs 溶液：FuGENE[®] HD 转染试剂：Opti-MEM[™] 转染体系（预混 15min），转染完成四小时后将培养基置换成低血清培养基，终止转染过程。

D) 细胞加药周期

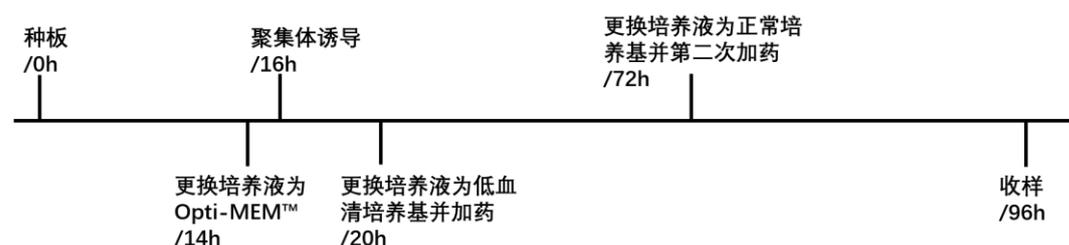


Figure 1. 细胞加药周期. 以种板为时间零点，斜线后时间为计算零点后时刻.

2.5.2 检测 α -synuclein 聚集体信号

A) 细胞裂解与蛋白样品收取

用于做 HTRF 的细胞样品使用 HTRF 裂解液，摇床上振荡裂解 1h。用于做 WB 的细胞样品使用 NP-40 裂解液，冰上裂解 30min。96 孔板的细胞直接吸取裂

解组分做 HTRF 实验（注意避免吸到块状沉淀）；12/24/48 孔板的样品经过 120,000 rpm 超速离心后分别检测上清与沉淀。

B) BCA 法测量蛋白浓度

我们使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒用于蛋白浓度的测定。每一次蛋白浓度的测定，重新配置并测定蛋白的标准曲线溶液（减小试剂的变性给蛋白浓度测定带来的误差）。在 Western Blot 与 HTRF 实验中，根据 BCA 法测得的蛋白浓度，将各样品的蛋白浓度依据组内最低值（删去离群值）调平。

C) HTRF(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, 均相时间分辨荧光)

我们通过比较使用 cisbo 公司的 Flag 抗体对、p-synuclein 抗体对、total synuclein 抗体对、与 synuclein aggregates 抗体对，最终选择使用 synuclein aggregates 抗体对以及 total synuclein 抗体对来分别表征 α -synuclein 产生的聚集体信号以及细胞内可溶的 α -synuclein 信号。

D) Western Blot 免疫印记

电泳条件设定 180V, 30min, 根据具体的电泳情况更改电泳时间，以确保条带较好地分离。药效实验中的 WB 采用干转，使用 eblot, 20V, 7min; CETSA 实验中的 WB 采用湿转，转膜缓冲液需要提前配置好并放在 4°C 冰箱中预冷。

2.5.3 小分子与蛋白结合实验

A) 微量热泳动实验 (MicroScale Thermophoresis, MST)

新鲜纯化的待检测蛋白在提前一天和 CY5 荧光染料过夜 4°C 孵育，蛋白与荧光染料的摩尔比控制为 1:3。次日，利用脱盐柱，将蛋白溶液中游离的染料分子洗脱，并且 12000 rpm, 2min 重复离心两次吸取上清，以除去蛋白沉淀，防止蛋白吸附在后续毛吸管上。将一定稀释浓度（例如 200nM）的标记荧光染料的蛋白上机检测，根据机器反馈的增益强度调整蛋白的终浓度，使其落在仪器较好的检测范围内（增益不可达到 100%，50% 附近较为合适）。将提前配置好的小分子母液（10% DMSO-PBS-P）二倍稀释到十六个浓度梯度，蛋白稀释液（PBS-P）和小分子稀释液 1:1 混合，最终获得含有不同小分子浓度梯度的 16 个小分子-蛋白混合体系（5% DMSO-PBS-P）。使用毛吸管吸入上机检测。

B) 细胞热位移分析 (Cellular Thermal Shift Assay, CETSA)

使用 293T 细胞以及 DAOY 细胞用于 CETSA 实验。由于需要检测的蛋白为

LC3, 在收取细胞的提前一天加入 CQ 抑制自噬。收取的细胞使用 PBS 重悬, 在 1.5mL EP 管中, 封口后在液氮中反复冻融 7-8 次以裂解细胞(液氮冻住后用 37°C 解冻), 若有肉眼可见未裂解彻底的细胞团块, 使用超声振荡器继续裂解。将超声破碎的细胞使用 BCA 法检测总蛋白浓度, 按照 20 μ g 总蛋白质量分装, 一组需要分装十二管共 240 μ g 蛋白(先配成总管)。设置不同的化合物浓度梯度 0、100 μ M、200 μ M, 每管 600 μ L (DMSO 3%), 室温在转盘上和蛋白孵育 1.5h。将孵育后的体系分装到 11 个小管中 (50 μ L)。在 PCR 仪上设置变温程序, 11 个小管分别对应 40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80°C 的温度梯度, 在对应温度孵育 3min 后, 取出 EP 管在室温冷却 3min, 离心后各取 36 μ L 上清用于后续 Western Blot 实验。

C) 表面等离子共振实验 (Surface Plasmon Resonance, SPR)

我们采用蛋白固定, 小分子流过的方法, 提前将待检测蛋白挂在芯片上(单通道挂对应蛋白)。在仪器开机后, 使用预先配置好的不同浓度梯度的含 DMSO 的 PBS-P 溶液校准 DMSO 对检测结果的影响。配置不同浓度梯度的化合物溶液 (5% DMSO-PBS-P), 将配置完好的溶液按一定体积加入对应九十六孔板的孔中, 贴膜后可上机检测(配置完需要尽快贴膜, 含 DMSO 的溶液容易挥发导致 DMSO 浓度不准确)。

2.5.4 分子对接

主要利用 AutoDock Vina 对 313-4 与 LC3 蛋白以及 α -synuclein 聚集体的结合位点进行预测。313-4 直接从 PubChem 网站下载对应分子的.sdf 文件, LC3 蛋白选用 PDB 数据库 1ugm 编号结构; α -synuclein 聚集体选用 PDB 数据库 6a6b 编号结构。小分子与蛋白在对接前需要进行分子的准备, 313-4 完成了可旋转与不可旋转键的标识; LC3 与 α -synuclein 聚集体去除了水分子以及数据库结构中可能包含的溶液离子, 并且对蛋白的氢键进行了标识。分子准备完成后, 由于对 313-4 可能的结合口袋并没有已知的线索, 采用全蛋白对接。

2.5.5 疾病型小鼠造模、行为学实验与脑组织分析

A) 小鼠脑定位注射造模

帕金森疾病模型小鼠的构建采用将 PFFs 或 PBS 对照溶液注射到小鼠双侧纹状体区域, 注射后 4-6 个月进行小鼠的行为学实验检验造模效果, 行为学检测后

取小鼠脑组织做脑组织切片染色分脑区判断小鼠疾病进展状况。预实验的小鼠使用人源化 α -synuclein 转基因小鼠，正式实验小鼠为野生型小鼠。

小鼠腹腔给体重百分之二质量的三溴乙醇使之产生麻醉，麻醉后的小鼠将头皮毛剪掉后固定在脑立体定位仪上。将小鼠头皮剪破，并且使用双氧水将小鼠脑壳外膜裂开，找到 Bregma 点。以 Bregma 点为定位基准，找到纹状体的位置（AP+0.2 mm; ML \pm 2.00 mm; DV -2.60 mm），使用颅骨钻将脑壳钻开，使用微量注射仪将含有 PFFs 或 PBS-*溶液双侧注射到小鼠纹状体（注射后注意停针以防止液体外流）。注射完成后手术缝合小鼠头皮，正常饲养。

B) 旷场实验

旷场实验（Open Field Test, OFT）主要用于评价小鼠的自主运动行为、探究行为以及焦虑状态。帕金森疾病模型小鼠被认为运动能力减弱，焦虑状态增加。

调试好设备通道后，将小鼠置于暗室暗适应十分钟，之后开始将小鼠按组别放置到对应旷场中，记录六分钟的小鼠自由活动轨迹，之后将小鼠放入原有笼盒并清理旷场，覆盖上一只小鼠留下的气味。在整个 OFT 实验期间，尽量避免不必要的活动与声音，以减少对小鼠自主探索行为的干扰。利用系统自带软件分析小鼠的平均位移以及在旷场中心区域活动的比例。

C) 爬杆实验

爬杆实验（Pole Test）主要用于评价小鼠的运动协调和平衡能力。帕金森疾病模型小鼠被认为运动协调能力减弱。

在正式实验之前，需要对小鼠爬杆行为进行训练。杆长约 40cm，每次实验将小鼠头朝下放置在竖直杆顶，待小鼠四爪抓住杆后放手使其顺杆爬下，每只小鼠重复测量不连续的四次下杆时间，取其平均值作为小鼠最终成绩。

D) 平衡木实验

平衡木实验（Beam-Walking Test）主要用于评价小鼠的运动协调性、平衡能力和精细的运动控制。帕金森疾病模型小鼠被认为运动平衡能力减弱，对精细的运动控制减弱。

平衡木装置主要由一个架高的平衡木（约 1m）以及平衡木一端的暗箱组成，暗箱面朝平衡木一侧开有小门可供小鼠通过，暗箱门内有红外检测装置。实验中，小鼠被放置在平衡木一端，依靠小鼠自发向暗箱运动，进入暗箱时触发红外装置

以记录其运动时长。在正式实验开始前，需要对小鼠进行平衡木训练，主要包括在暗箱内放置一定垫料与粮食，使其有自发向暗箱运动的意愿（每只小鼠单独放置于暗箱适应，并且不同小鼠适应之间需要更换垫料）；将小鼠由近及远地置于平衡木的不同位置，使其逐渐适应从平衡木返回暗箱的过程。经实验验证，我们认为将平衡木远离暗箱的一端略微垫高（约 10cm）更有助于小鼠产生自发返回暗箱的意愿。每只小鼠不连续地重复测量三次从平衡木一端返回暗箱的时间，取最小值作为小鼠最终成绩。

E) 握力实验

握力实验（Grip Strength Test）主要用于评价小鼠前肢和后肢握力。帕金森疾病模型小鼠由于其肌肉控制能力减弱，应当有更小的握力。

从尾部抓住小鼠，使其前爪刚好搭在握力检测网上，调整小鼠身体角度与水平呈约 15°角（每只小鼠保持一致即可），向后拖拽小鼠尾巴使其前肢发力，直至小鼠松开前肢为止，仪器将自动记录过程中产生的最大拉力。每只小鼠不连续地重复测量三次最大握力，取平均值作为小鼠最终成绩。

F) 步态实验

步态实验（Gait Analysis）主要用于评价小鼠的运动协调性、步态周期、步长、步宽、关节角度等。帕金森疾病模型小鼠的运动协调性减弱，步态参数与正常小鼠有所差异。

在进行步态实验前，需要通过预实验选择一个合适的传送带速度使得给予小鼠的运动时间适中（时间过长小鼠有出现调转方向的探索行为，时间过短小鼠容易尾巴夹到传送带间隙）。正式实验时，记录小鼠在传送带上运动 19s 的录像。位于透明传送带下方的摄像头会记录小鼠运动的全过程，系统自带的分析软件基于图像识别，显示出小鼠四个脚掌落在传送带上的每一次，并且根据图像分析出包括步态周期、步长等在内的 315 个参数。

步态实验的数据分析使用主成分分析（Principle Component Analysis, PCA）的方法。以 PBS 和 PFF 组的小鼠为主成分坐标系建立的数据源，将包含 315 个维度的数据输入建立坐标系。给药组的数据直接投射到该坐标系中。

G) 转棒实验

转棒实验（Rotarod Test）主要用于评价小鼠运动协调能力和平衡能力。帕金

森疾病模型小鼠的运动协调性减弱。

在进行转棒实验前，需要通过预实验选择一个合适的转棒速度使得小鼠不会过快掉下转棒，也不会出现抱着转棒旋转的行为。转棒装置分为六个通道，可以支持同时六只小鼠同时登上转棒，时间开始后转棒旋转，站立不稳掉下的小鼠给底板施加压力，使得该通道计时停止，待所有六只小鼠掉下转棒该组实验结束。每只小鼠不连续地重复测量三次停留时间，取平均值作为小鼠最终成绩。

H) Y 迷宫实验

Y 迷宫实验 (Y-maze Test) 主要用于评价小鼠空间工作记忆和辨别性学习能力。帕金森疾病模型小鼠在运动功能受到削弱外，认知学习能力也会受到影响。

Y 迷宫为一个形如三叶草形状的空间装置，实验开始时小鼠被放入中间区域，小鼠会在一定时间内自主进入不同的区域进行探索。每个通道门控带有红外感应，小鼠进入事件会被记录下来。每只小鼠我们记录 10min 内所有事件发生的次数。

Y 迷宫数据处理中，我们把在三次连续的探索行为发生在三个不同的通道视为一次“正确”，例如 A→C→B；如果出现相同通道的重复探索，例如 C→A→C 则视为一次“错误”。拥有良好空间工作记忆的小鼠更倾向于探索不同的空间，会有着更高的正确率。

I) 小鼠脑组织染色实验

将小鼠心内灌流取脑组织后，将半脑置于新鲜配置的 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 溶液中保存。使用冷冻切片机将小鼠半脑分脑区沿冠状面切出若干脑截面。贴片后，将脑冷冻切片使用 DAB 染色。使用 VS200 全玻片扫描系统对脑组织切片高通量扫描，对黑质区、海马区、运动皮层区、纹状体区分别进行细胞存活数以及聚集体信号的分析。

三、研究结果

3.1 体外初步筛选特异性靶向 α -synuclein 聚集体的小分子化合物

药物的初步筛选是基于光科学与工程系费义艳老师课题组提供的光学芯片，芯片将 3375 种化合物以成对的形式共价连接在玻璃片上组成微阵列（small-molecular-microarray, SMM），当纯化的 α -synuclein 蛋白单体和聚集体分别从不同通道流经芯片的时候，通过免标记斜入射光反射差（oblique-incidence reflectivity difference, OI-RD）技术可以筛选出特异性结合 α -synuclein 聚集体的小分子化合物[8]。通过这种方法，我们得到了种可能的特异性靶向降解 α -synuclein 聚集体的候选化合物。

3.2 过表达人源 α -synuclein 的 PC12 细胞株的构建

PC12 细胞贴壁完全后，将包裹 FLAG 对照以及 syn-FLAG 的慢病毒感染细胞，48h 后加入嘌呤霉素压力筛选稳定表达 FLAG 或 syn-FLAG 的 PC12 细胞稳转株一周后，通过流式分选获取单细胞克隆，待细胞扩增后进行验证（Figure 2）。

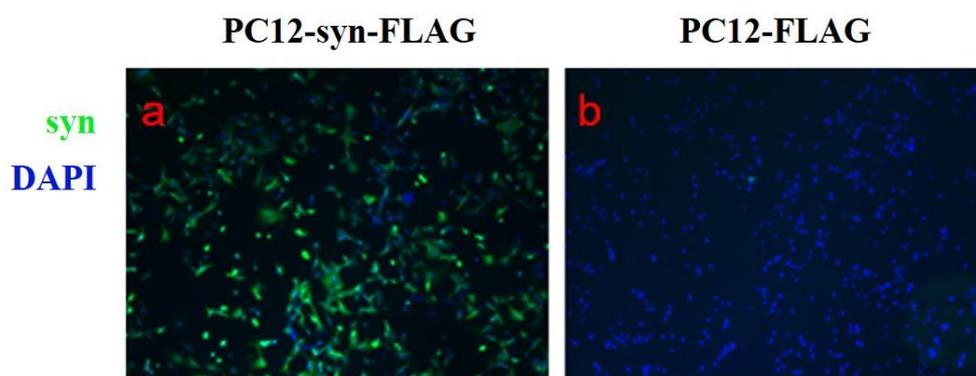


Figure 2. 构建过表达人源 α -synuclein 的 PC12 细胞株（PC12- α -synuclein），a.稳定表达 syn-FLAG 的 PC12 细胞，b.稳定表达 FLAG 的对照细胞。图示为免疫荧光实验，绿色荧光标记人源 α -synuclein，蓝色荧光为 DAPI 信号

3.3 搭建 PFFs 诱导细胞形成可检测聚集体信号的实验方法

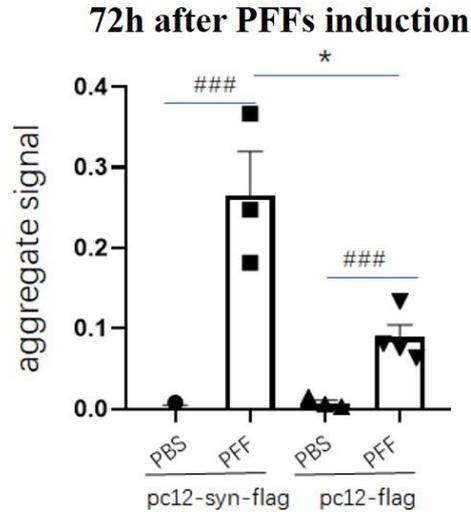


Figure 3. PFFs 诱导 PC12- α -synuclein-flag 稳转株产生稳定的聚集体信号，并且通过 HTRF 检测

通过对 PFFs 转染方式（尝试不同转染试剂以及直接加 PFFs）、转染体系配比、以及转染时间的摸索，我们构建了利用纯化 α -synuclein 形成的 PFFs 诱导细胞产生 α -synuclein 聚集体的细胞模型，并通过 HTRF 检测聚集体含量（Figure 3）。

HTRF 实验相比于 FRET，利用稀土元素（如铕 Eu 或铽 Tb）的长荧光寿命特性，通过在激发后设定一个时间延迟（例如 50 μ s 或者 150 μ s），从而可以利用背景普遍荧光信号的迅速衰减，使得信噪比大大提高，有效增加了检测的灵敏度和准确性。而经典的 HTRF 实验主要用于检测蛋白的互作。在我们的研究中，由于 α -synuclein 聚集体由许多单体堆积缠绕形成，通过选择使用靶向 α -synuclein 单体的抗体分别偶联荧光供体与受体，当单体产生聚集，则可以期待供体与受体在空间上产生接近，等价于蛋白产生互作的情境，因此可以通过 HTRF 的信号来检测聚集体的有无与多少。

3.4 通过 HTRF 实验初步评价初筛化合物药物效果，313-4 化合物在候选化合物中有着最好的降解聚集体信号的效果

Drug treatment for 72h

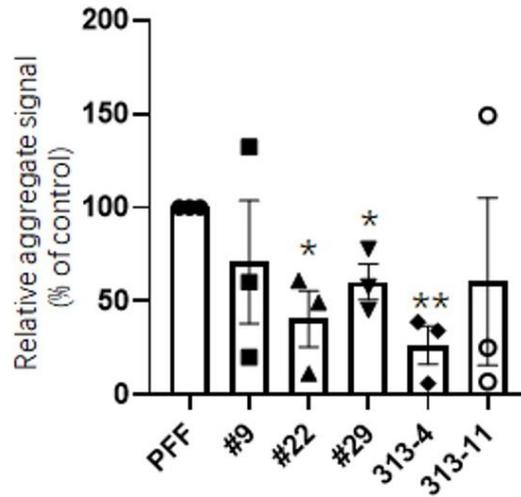


Figure 4. 初步药效评价候选化合物，313-4 化合物降解聚集体信号效果最好且稳定
针对芯片筛选可同时与 LC3 以及 α -synuclein 蛋白结合的候选化合物，我们主要使用 HTRF 的方法来对其进行药效检测与比较。

最终的实验结果表明，313-4 化合物相较于其他化合物有着更好的降低聚集体信号的效果，并且在几次重复实验中较为稳定，因此选择 313-4 作为后续探究其降低聚集体信号机制的化合物。

3.5 313-4 的药物效果呈浓度依赖性，并且在功能上挽救细胞凋亡

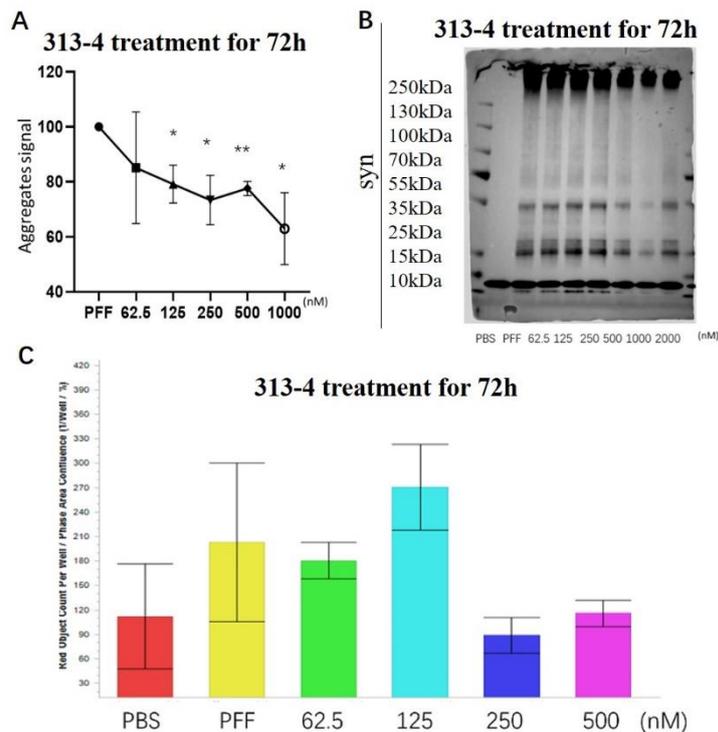


Figure 5. A、B. 随着 313-4 浓度升高， α -synuclein 聚集体信号有下降趋势，可溶性 α -synuclein 不受影响

C. 313-4 药物浓度升高可以减少聚集体细胞模型凋亡的发生

为了探究 313-4 降低聚集体信号的最适处理浓度，我们将 313-4 拉开浓度梯度进行药效检测，HTRF 与 WB 的结果显示 313-4 对聚集体信号的降低作用具有浓度依赖性（Figure 5 A,B）。

α -synuclein 聚集体可导致神经元产生内质网应激、线粒体损伤、膜电位失衡、细胞内蛋白降解通路受损等细胞毒性，进而引发神经元的凋亡。为了观察 313-4 对疾病模型细胞损伤的拯救作用，我们利用 Incucyte 实时拍摄药物处理后的 PC12 疾病模型细胞，在 Day3 更换培养基的时候同时加入细胞凋亡显色剂碘化丙啶（Propidium iodide, PI），并且在 Day4 进行荧光拍摄，发现 PC12 细胞凋亡的程度随药物浓度升高而降低，证明了 313-4 在功能上可以挽救 α -synuclein 聚集体的毒性导致的细胞凋亡。

3.6 313-4 通过自噬依赖的途径降解 α -synuclein 聚集体

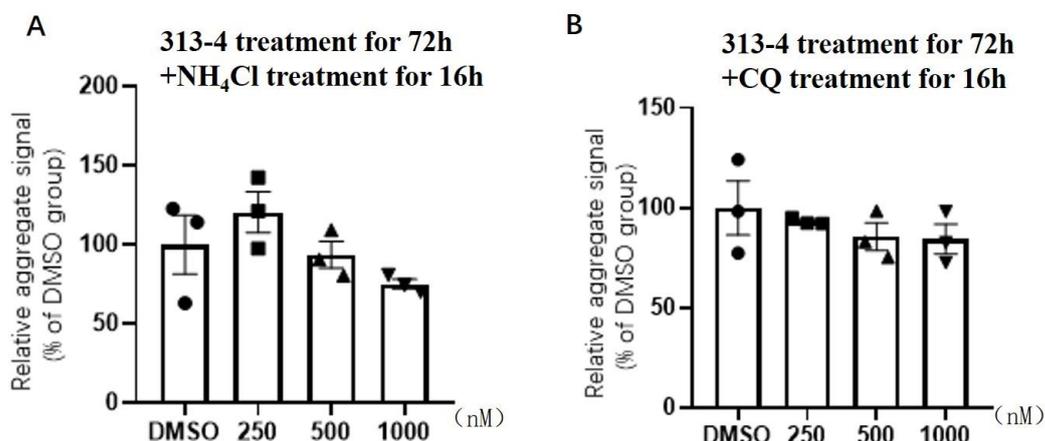


Figure 6. NH₄Cl 与 CQ 阻断自噬后，313-4 药效废除。收取细胞前 16h 加入自噬阻断剂。

为了进一步确认 313-4 发挥降低 α -synuclein 聚集体的具体途径，基于在芯片实验中得到的 313-4 与 α -synuclein 聚集体以及 LC3 蛋白结合的实验数据，我们推测 313-4 可能通过同时连接 LC3 蛋白与 α -synuclein 聚集体的作用将二者在细胞内的距离拉近，从而将 α -synuclein 聚集体拉进自噬通路中降解，即发挥 ATTEC 小分子的作用。为了证明这个猜想，我们首先验证 313-4 是否通过促进自噬通路实现对聚集体的降解。通过加入自噬阻断剂 Chloroquine (CQ) 和 NH₄Cl 阻断自噬，313-4 对聚集体的降解效果丧失 (Figure 6)，说明 313-4 通过自噬依赖的途

降解 α -synuclein 聚集体。

3.7 313-4 体外实验验证与 LC3 蛋白以及 α -synuclein 聚集体的结合

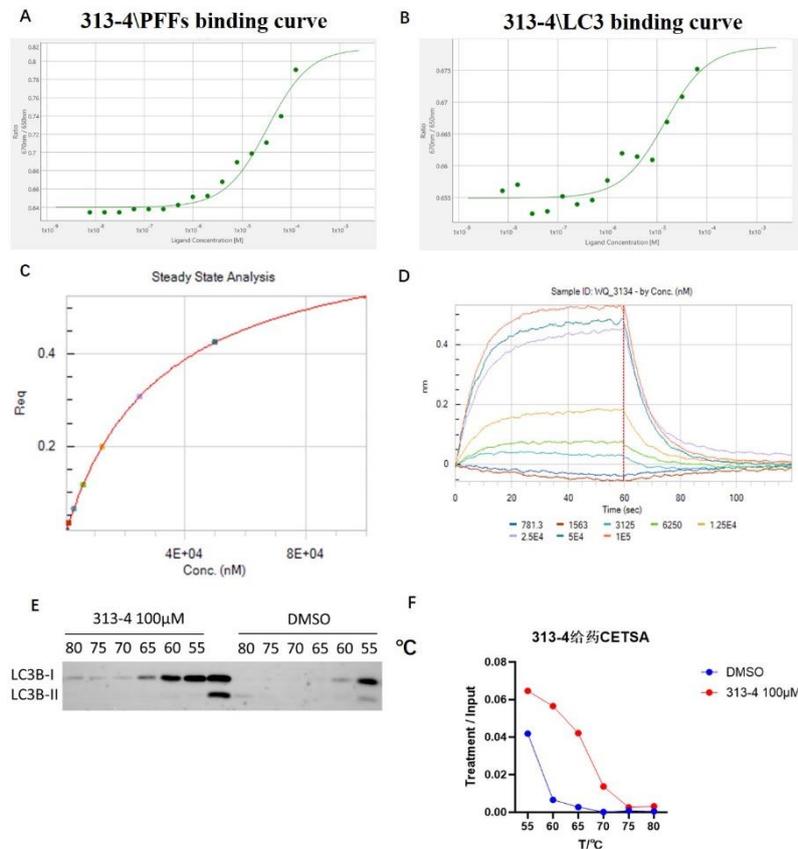


Figure 7.A.MST 检测 313-4 与 PFFs 结合, $K_d=33\mu\text{M}$. B.MST 检测 313-4 与 LC3 结合, $K_d=14\mu\text{M}$. C、D.SPR 检测 313-4 与 LC3 结合. E、F.CETSA 检测 313-4 与 LC3 结合, 并增加 LC3 蛋白热稳定性

为了进一步确认 313-4 是否通过发挥 ATTEC 小分子的机制降解 α -synuclein 聚集体, 我们通过体外小分子与蛋白结合实验来验证 313-4 与目标蛋白的结合作用。

MST 基于当分子周围存在温度梯度时, 会由于随机运动从高温区向低温区位移。我们利用 MST 实验分别检测小分子化合物与 PFFs 以及 LC3 蛋白的相互作用情况。通过 MST 实验, 我们将 LC3 蛋白与 α -synuclein 聚集体分别使用 CY5 染料标记, 313-4 与 LC3 蛋白和 α -synuclein 聚集体分别拟合出 $14\mu\text{M}$ 和 $33\mu\text{M}$ 的 K_d 值 (Figure 7 A,B)。值得注意的是, 由于标记蛋白浓度的测定先于蛋白离心, 软件拟合所得的 K_d 值比实际值偏大。

SPR 基于光在以特定角度照射到金属表面时, 会产生集体振荡的自由电子, 从而引起光强度的降低。蛋白被事先悬挂在生物传感器上, 如果流过的配体

有结合会导致局部质量的增加，从而引起光强度的显著变化。我们将 LC3 蛋白挂在等离子共振芯片上，将不同浓度的 313-4 溶液流过芯片，曲线拟合 313-4 与 LC3 蛋白有结合作用 (Figure 7 C,D)。

CETSA 基于蛋白在高温容易被分解的特性，小分子结合蛋白会一定程度上改变蛋白的热稳定性，如果热稳定性的改变在可以测量的区间，那么就可以用来检验小分子与蛋白的相互作用。通过 CETSA 实验，我们收取使用自噬阻断剂 CQ 预处理的 293T 细胞，将细胞裂解液与不同浓度的 313-4 溶液共同孵育并置于不同温度梯度下进行蛋白热稳定性检测。通过 WB 实验，我们证明了随着 313-4 浓度的升高，高温下 LC3 蛋白的热稳定性增强，证明了 313-4 可以和 LC3 蛋白结合。

基于芯片上的实验数据，通过 MST、SPR、CETSA 实验，我们在体外进一步证明了 313-4 与 LC3 和 α -synuclein 聚集体的结合。

3.9 313-4 和 LC3 与 α -synuclein 聚集体的结合位点预测

为了进一步证明 313-4 与 LC3 和 α -synuclein 聚集体的结合在体内是同样可以实现的，一个比较好的方法是构建 LC3 或 α -synuclein 的突变体以废除 313-4 的药效。为了构建一个蛋白突变体，我们需要首先找到 313-4 结合的关键位点，因此采用生信的方法先行预测结合位点。通过利用 AutoDock Vina 使用 313-4 与二者进行全蛋白对接 (docking) (Figure 8)。对接的结果显示如 Figure 8。

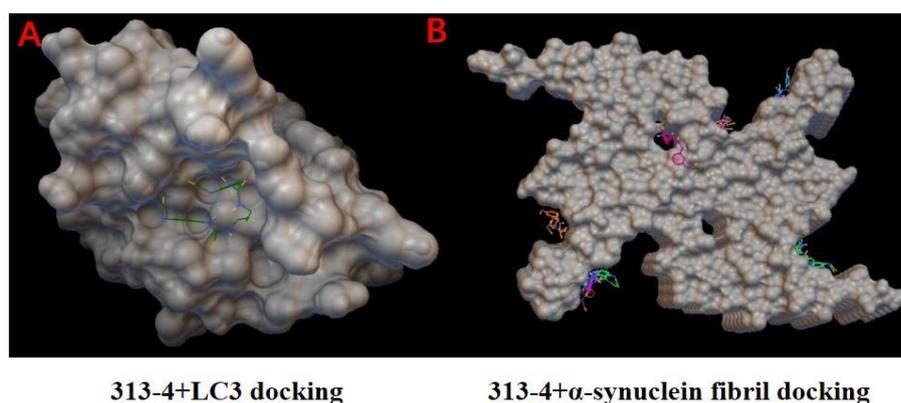


Figure 8.使用 AutoDock Vina 预测 313-4 与目标蛋白结合.A.313-4 与 LC3 (1 μ g/ml) 蛋白结合预测.B.313-4 与 α -synuclein 聚集体 (6a6b) 蛋白结合预测.

3.10 α -synuclein 聚集体疾病型小鼠模型造模显示差异性

本研究由于选取 α -synuclein 聚集体作为研究的关键靶点，因此选取采用聚集

体诱导产生的帕金森病小鼠疾病模型。通过脑定位注射实验，将 PFFs 蛋白注射到小鼠的双侧纹状体脑区，接着在数月的时间内，小鼠脑内的聚集体产生播散并导致疾病的进展。通过旷场、爬杆、握力、步态、Y 迷宫、平衡木、转棒等一系列行为学实验评价小鼠疾病模型的造模效果。

通过对预实验中分行为学实验进行分析，在旷场、步态、以及转棒实验中造模组与对照组小鼠的小鼠产生了行为学上的显著性差异（Figure 9）。这与帕金森病在人类身上的症状是相吻合的，为正式实验行为学实验的选择提供了参考信息。

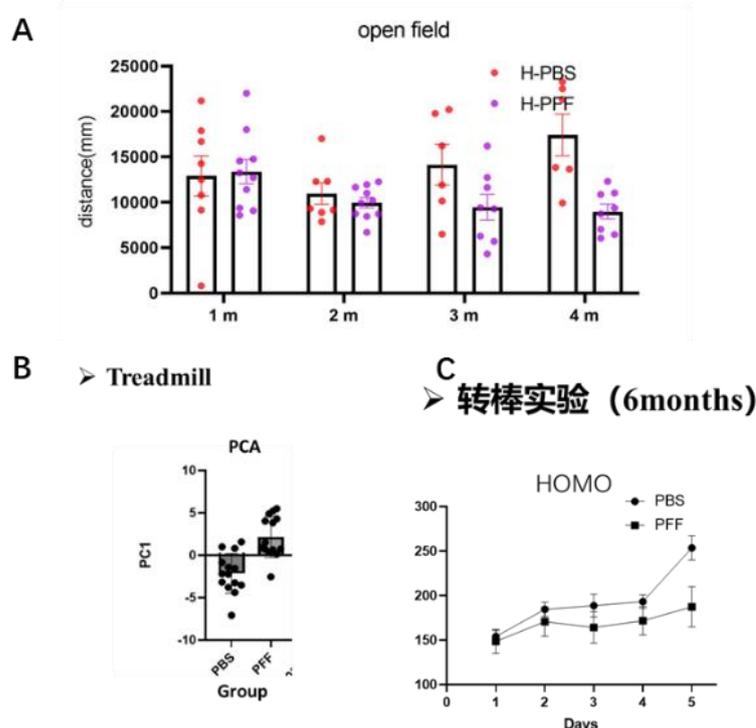


Figure 9.A. 疾病型小鼠造模四个月时旷场实验显现出显著性差异，疾病型小鼠在同样的时间内行走的距离更短 **B.** 主成分分析步态参数显现出显著性差异（PC1 ~ 40%）
C. 疾病型小鼠造模六个月时转棒实验，人源化 α -synuclein 纯合子小鼠造模组和对照组在学习四天后，在转棒上停留的时间出现显著性差异

在做完行为学实验后，通过将小鼠心脏灌流后取脑组织，将半脑进行冷冻切片，对海马、纹状体、黑质、运动皮层等脑区进行分脑区组织染色分析；分别对脑区内神经元存活情况以及聚集体播散情况进行分析。脑组织切片染色实验展示了模型组小鼠与对照组小鼠在纹状体区的聚集体播散情况以及黑质致密部多巴胺能神经元存活情况有显著性差异（Figure 10）。

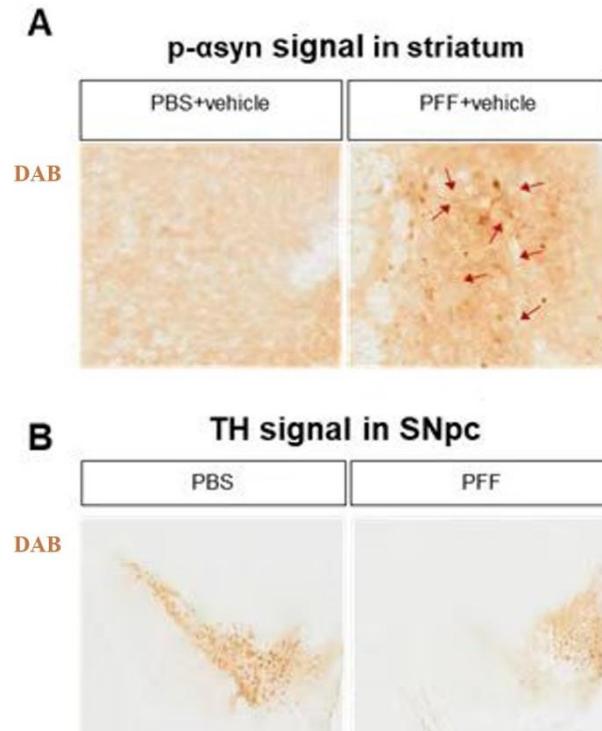


Figure 10. A.纹状体区域磷酸化 α -synuclein 染色，红色箭头标记处为 DAB 染色显示的聚集体位置 B.黑质致密部多巴胺能神经元染色

四、讨论

4.1 实验结果回顾与讨论

本研究旨在寻找特异性降解 α -synuclein 聚集体的候选化合物，并验证这些化合物在细胞和小鼠模型中的效果。

通过光学芯片的筛选，我们发现了一系列可能特异性结合 α -synuclein 聚集体的小分子化合物。其中，313-4 在细胞水平表现出最佳的降低聚集体信号的效果，因此被选定作为后续研究的重点化合物。我们发现 313-4 对聚集体信号的降低作用呈现出浓度依赖性。此外，通过实时细胞成像，我们观察到 313-4 可以减轻 α -synuclein 聚集体引起的细胞凋亡，表明其具有细胞保护作用。进一步研究显示，313-4 通过促进自噬通路来降解 α -synuclein 聚集体。自噬阻断剂的加入导致 313-4 的降解效果丧失，表明其作用依赖于自噬。BLI 和 CETSA 实验结果表明，313-4 可能通过与 LC3 蛋白结合，促进 α -synuclein 聚集体被引入自噬溶酶体通路中进行降解。为了验证在细胞水平得到的结果，我们将在聚集体疾病型小鼠模型中进行了给药实验。模型小鼠在转棒、步态和旷场等行为测试中显示出与对照组明显不同的表现，证明了模型的成功建立。这为进一步在动物模型中验证 313-4 的药效提供了基础。

本研究发现，候选化合物 313-4 可以通过促进自噬途径降解 α -synuclein 聚集体，表现出良好的降低聚集体信号、浓度依赖性和细胞保护作用。这为开发新型 PD 治疗药物提供了潜在的靶点和策略。进一步的研究将重点关注 313-4 的作用机制、生物利用度以及长期在动物模型中的疗效评估，以期为 PD 及其他共核蛋白病的治疗提供新的思路和药物选择。

4.2 PFFs 提供的聚集体本底信号问题

在 Western Blot 实验中，由于使用的是 flag 抗体对 α -synuclein 进行标记，因此可以排除掉外源加入的 PFFs 对实验结果的影响。但是在 HTRF 实验中，由于使用的抗体对是 α -synuclein 的抗体对，在对照组中，我们始终有一个不可抹除的本底聚集体信号，我们推测这来自外源加入的 PFFs。

针对这个本底的信号，我们尝试过在收取细胞前使用 PBS 溶液对细胞进行多

次清洗，以期洗掉粘附在细胞表面的 PFFs，但是收效甚微。因此在后续的实验中，我们通过把 PC12-空-flag 的 HTRF 聚集体信号作为基准值，各组信号需要减去基准值来定量药效。但是粘附在细胞表面的 PFFs 受多种因素的影响，PC12-空-flag 细胞与 PC12-syn-flag 细胞在形态上本身就有所区别，也会给这种定量方法究竟是否足够精确带来疑问。此外，在多次的药效验证实验中，我们还遇到了对照组与疾病组细胞 HTRF 信号窗口过小的问题，这也导致了数次药效实验的失败。因此，找到一种合适的去除本底信号的方法也是能够更好的进行药效等实验的基础步骤。

目前一个尚未验证的实验方法如下：是否可以利用蛋白酶的消化能力来去除胞外的 PFFs？蛋白酶一般不具有膜透过性，经常被用于体外的蛋白消化实验，例如核酸提纯等。但是 PFFs 的结构包含了大量 β -sheet 结构，赋予了其结构稳定性，使用一般的蛋白酶可能无法很好地将其消化。因此我猜想可以使用变性剂加上蛋白酶联用的方式来消化胞外的 PFFs。经前期文献查阅，尿素或盐酸胍可以作为很好的与多种蛋白酶兼容的蛋白变性剂，蛋白酶 K、丝氨酸蛋白酶等蛋白酶具有较好的消化切割蛋白的能力^[24-25]。在收取细胞之前，联用变性剂与蛋白酶消化一段时间，再将蛋白酶淬灭后收取细胞，或许可以解决 PFFs 胞外本底信号问题。

4.3 化合物药效实验遇到的问题

值得注意的是，药效实验是本研究从数个小分子候选化合物中进一步筛选最适小分子化合物的关键实验，在项目的推进过程中，药效实验的时间占比占了很大一部分。除了药效实验本身对生物学重复次数要求比较高，在实验中我们还遇到了一些其他的问题阻碍着药效实验的推进。

遇到的最显著的问题是同一种化合物在不同批次的实验之间药效差异较大。经实验检验，我们认为有以下几种原因都会导致化合物药效的差异。首先是化合物本身的问题，在实验之初我们没有很严格地将化合物分装，这可能会导致化合物在反复冻融的过程中变性失活，后来我们选择将化合物分装到八联管中避免了这种问题。化合物的来源同样会对药效产生影响。从不同公司购买的同一种化合物，甚至是同一个公司购买的不同批次化合物之间也存在着药效的差异，我们曾经检测过从 A 司和 B 司同时购买 313-4 化合物并且同一批次检验药效，二者显

现出了明显的区别,这种情况可能需要归因于化合物生产的纯度问题以及公司的储存与运输条件问题。此外,细胞的培养条件可能对药效也会产生比较大的影响。在实验室的培养条件产生染菌的一段时间,我们在细胞培养液中加入了双抗,在加入双抗之后,发现药效出现了部分丧失的现象,这让我们怀疑仅仅通过加入双抗这样的培养条件也可能对化合物的药效产生影响。最后,同一个细胞系的不同单克隆对药效的影响也十分显著。在实验过程中,我们曾挑选了数个 PC12-syn-flag 的单克隆细胞株做后续实验,发现部分细胞株对化合物的药效不敏感,这让我们重新回到多克隆的 PC12-syn-flag 来进行药效实验。

4.4 p-syn 信号与聚集体信号不同步问题

磷酸化 α -synuclein 信号 (p-syn) 往往与共核蛋白病的疾病进展相关,常常被用作疾病型 α -synuclein 的标志^[26]。在 HTRF 与 WB 实验中,我们曾多次使用 p-syn 的抗体来指征聚集体的信号,在多数情况下聚集体的信号和 p-syn 的信号同步。但是在挑选的 PC12-syn-flag 的某一个单克隆细胞株内,我们发现该细胞株相较于其他细胞株有着更高的聚集体信号,而 p-syn 的信号几乎为 0,这预示着该细胞株内和 p-syn 相关通路的蛋白可能产生了突变。这种突变如何影响 p-syn 的生成,又如何影响疾病表型的出现,不失为一个值得探索的问题。

4.5 小鼠脑组织聚集体信号检测难题

关于预实验小鼠脑组织的分析,我们提供了脑组织的染色切片,在使用 WB 与 HTRF 定量脑组织聚集体信号的时候,我们遇到了聚集体信号过低的问题。虽然通过超速离心,能够区分出单体(上清)与聚集体(沉淀)形式的 α -synuclein,但是在 WB 的条带中, α -synuclein 只出现在单体的位置,这说明即使存在聚集体,在处理的过程中也可能被打碎成单体的状态。为了提高降解聚集体 α -synuclein 的说服力,如果能够在 WB 中呈现出聚集体 α -synuclein 信号的降低将会是可信度很高的证据。

相较于在细胞中的实验,小鼠体内实验产生这种现象的原因可能是 PFFs 播散的效率不同,以及浓度的不同。此外,小鼠脑内组织的细胞类型有很强的异质性,这导致可能部分未被感染的细胞类型稀释了聚集体信号的强度。为了更好地展现聚集体原本的形式,一个实验猜想是利用交联剂如葡聚糖硫酸钠盐 (Dextran Sulfate Sodium Salt, DSS) 来稳定聚集体的形态,将会对更好的呈现聚

集体 α -synuclein 信号的下降提出更有说服力的证据。经前期的文献查阅，即使在变性胶的情况下使用 DSS，仍然能够观察到多聚 α -synuclein 的存在，佐证了该实验的可行性^[27]。除此之外，利用聚集体能够诱导单体形成新的聚集体这一特性，结合 ThT 实验，也许也能检测到脑组织样品中存在的微量聚集体的信号。通过 ThT 强度以及达到阈值的振荡天数的差别，用来验证化合物的药效^[28]。

参考文献

1. Wilson DM 3rd, Cookson MR, Dewachter I, et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases[J]. *Cell*. 2023, Feb 16;186(4):693-714.
2. Lamotte G, Singer W. Synucleinopathies[J]. *Handb Clin Neurol*. 2023;196:175-202.
3. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015 Aug 29;386(9996):896-912. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies[J]. *Nature*. 1997, Aug 28;388(6645):839-40.
4. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Nussbaum RL, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease[J]. *Science*. 1997, Jun 27;276(5321):2045-7.
5. Das T, Ramezani M, Eliezer D, et al. The Role of Membrane Affinity and Binding Modes in Alpha-Synuclein Regulation of Vesicle Release and Trafficking[J]. *Biomolecules*. 2022, Dec 5;12(12):1816.
6. Burré J, Sharma M, Südhof TC, et al. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, Oct 7;111(40):E4274-83.
7. Outeiro TF, Putcha P, McLean PJ, et al. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells[J]. *PLoS One*. 2008, Apr 2;3(4):e1867.
8. Winner B, Jappelli R, Riek R, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011, Mar 8;108(10):4194-9.
9. Cremades N, Cohen SI, Klenerman D, et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein[J]. *Cell*. 2012, May 25;149(5):1048-59.
10. Prots I, Veber V, Winner B, et al. α -Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay[J]. *J Biol Chem*. 2013, Jul 26;288(30):21742-54.
11. Pagano G, Taylor KI, Prasinezumab Study Group, et al. Trial of Prasinezumab in Early-Stage Parkinson's Disease[J]. *N Engl J Med*. 2022, Aug 4;387(5):421-432.
12. Meissner WG, Traon AP, AFF009 Study Investigators, et al. A Phase 1 Randomized Trial of Specific Active α -Synuclein Immunotherapies PD01A and PD03A in Multiple System Atrophy[J]. *Mov Disord*. 2020, Nov;35(11):1957-1965.
13. Mittal S, Bjørnevik K, Scherzer CR, et al. β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease[J]. *Science*. 2017, Sep 1;357(6354):891-898.
14. Grosso Jasutkar H, Oh SE, Mouradian MM, et al. Therapeutics in the Pipeline Targeting α -Synuclein for Parkinson's Disease[J]. *Pharmacol Rev*. 2022, Jan;74(1):207-237.
15. den Heijer JM, Kruithof AC, Groeneveld GJ, et al. A randomized single and multiple ascending dose study in healthy volunteers of LTI-291, a centrally

- penetrant glucocerebrosidase activator[J]. *Br J Clin Pharmacol*. 2021,Sep;87(9):3561-3573.
16. den Heijer JM, Kruithof AC, Lansbury P, et al. A Phase 1B Trial in GBA1-Associated Parkinson's Disease of BIA-28-6156, a Glucocerebrosidase Activator[J]. *Mov Disord*. 2023 Jul;38(7):1197-1208.
 17. Jennings D, Huntwork-Rodriguez S, Troyer MD, et al. Preclinical and clinical evaluation of the LRRK2 inhibitor DNL201 for Parkinson's disease[J]. *Sci Transl Med*. 2022,Jun 8;14(648):eabj2658.
 18. Li Z, Wang C, Wang Z, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds[J]. *Nature*, 2019,575(7781):203-209.
 19. Fu Y, Chen N, Lu B, et al. Degradation of lipid droplets by chimeric autophagy-tethering compounds[J]. *Cell Res*. 2021,Sep;31(9):965-979.
 20. Tan S, Wang D, Lu B. Targeted clearance of mitochondria by an autophagy-tethering compound (ATTEC) and its potential therapeutic effects[J]. *Sci Bull (Beijing)*. 2023, Dec 15;68(23):3013-3026.
 21. Pei J, Pan X, Ouyang L, et al. Developing potent LC3-targeting AUTAC tools for protein degradation with selective autophagy[J]. *Chem Commun (Camb)*. 2021,Dec 7;57(97):13194-13197.
 22. Dong G, Wu Y, Sheng C, et al. Ispinesib as an Effective Warhead for the Design of Autophagosome-Tethering Chimeras: Discovery of Potent Degradors of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) [J]. *J Med Chem*. 2022,Jun 9;65(11):7619-7628.
 23. Polinski NK, Volpicelli-Daley LA, Dave KD. Best Practices for Generating and Using Alpha-Synuclein Pre-Formed Fibrils to Model Parkinson's Disease in Rodents. *J Parkinsons Dis*. 2018,8(2):303-322.
 24. Brown J, Lu CL, Coburn J, Kaplan DL. Impact of silk biomaterial structure on proteolysis[J]. *Acta Biomater*. 2015,Jan;11:212-21.
 25. Upadhyay AK, Murmu A, Panda AK. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*. 2012,7(3):e33951.
 26. Abdul-Rahman T, Herrera-Calderón RE, Alexiou A, et al. The potential of phosphorylated α -synuclein as a biomarker for the diagnosis and monitoring of multiple system atrophy[J]. *CNS Neurosci Ther*. 2024,Apr;30(4):e14678.
 27. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ, et al. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation[J]. *Nature*. 2011, Aug 14;477(7362):107-10.
 28. Okuzumi A, Hatano T, Hattori N, et al. Propagative α -synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies[J]. *Nat Med*. 2023,Jun;29(6):1448-1455.

致 谢

写致谢的时候，脑中浮现的事情很多，下笔却是空白，不知道该用什么样的逻辑开始与串联，于是打算随心来写。

这篇毕业论文的工作开始于 2022 年的秋天，当时准备换课题的我寻求鲁伯坝老师的意见，在他的建议下我跟随王晴师姐学习，也开始了这个项目最开始的部分。但是由于那个学期我们在补上个学期因为封控导致落下的实验课，以及寒假因为解封提前回家的缘故，我只有断断续续的一些时候来跟着师姐帮忙和学习。真正开始比较有大块时间投入到这个项目的时候是到了第二年的春天，那个时候这个课题的进度主要推进到从初筛的化合物中进一步在细胞上进行药效筛选。这让我回想起最初做实验的时候，因为对于实验室经验几乎像一张白纸的我来说，什么都是新的需要学习，但是师姐非常细心且耐心地教会我实验的各个步骤与细节，从体外实验到细胞实验再到动物实验，她教会了我很多东西。而且师姐并不是以一个“Boss”的姿态来“安排工作”，她会希望你参与到关于对这个课题的思考当中去，我记得当我第一天去找她，她拿出来一张白纸用铅笔在上面写写画画，从各个细节给我讲清楚了这个问题主要的科学问题是什么以及背后的现实意义。王晴师姐是我觉得是我想感谢的第一个人，她对我在实验室中的个人成长提供了很大的帮助。

最近，我们把 313-4 以及其他的一些化合物在我们在 2023 年夏秋预先造模的 PFFs 诱导疾病型小鼠上给药，收集了一些行为学数据后正在进行组织分析的工作。这个课题从开始科学问题的设想以及假设的提出，到后来遇到每一个难题的时刻问题的解决，都离不开鲁老师的指导与规划。鲁老师是一个让我觉得加入他的实验室很幸运的一位老师。开始加入鲁老师实验室是在这个课题开始一年以前的秋天，大二的我通过邮件联系老师，表达了希望在老师的实验室中学习的愿望。老师的行程其时塞得很满，多次相约面谈却都有了会议冲突。在一个晚上我接到了鲁老师的电话，他在询问了我的学习情况后，问了我诸如 PCR 中 T_m 值的含义等诸如此类的几个问题作为面试，然后他讲起了经典的研究蚂蚱的问题。接到电话的时候我很紧张，待到电话结束的时候我已经很放松并且有些开心了。后

来和老师的相处印证了最初的印象。鲁老师是一个智慧并且温柔的人。他对于领域的熟悉程度以至于当你提出某个问题时，他能够反应出某个课题组在某年做了一个相关的某事，仿佛是刚刚才读过那篇工作，虽然可能已经隔了很久。忽然想到的一件非常好玩的事情是，在课题组团建打真人 CS 的时候，鲁老师采取了和大家横冲直撞不一样的策略，在战地的边缘“打黑枪”，这样可以避免脆弱的背身受到攻击，这也是智慧的体现吧（笑）。即使在会议忙碌的时节，鲁老师也坚持每周都和大家进行“121”的工作进展 talk，了解工作进度的同时，关心实验室每一个成员的个人成长。鲁老师既给了实验室成员自由的发展空间，又给予及时的关心和帮助，我对能够在鲁老师的实验室学习与工作感到非常幸运和感激。

我很喜欢我的实验室同门们，大家不仅在生活上会相互关心，在实验方法与技术上“互通有无”，对于讨论彼此的课题也持开放和乐于交流的态度。这种融洽的氛围让我很开心在这里工作。同时我要感谢实验室师兄师姐对我各方面的关心与帮助。王慧兰师姐和杨箬楠师姐为这篇毕业论文的写作提供了直接的帮助，感谢她们。

在这篇论文的工作以外，我想我还有许多想要感谢的人，他们或多或少为我的生活增添了快乐，或深或浅在我的人生中留下脚印。生科院的同班同学中，我想感谢他们中的很多人，他们有的成为了我的室友，有的成为了我的实验室同门，有的成为了我大学中的朋友，有的我想会成为人生的朋友，还有一位成为了我的恋人。风景之所以好看是因为有人相伴才可以，过往值得纪念也是因为和一些人一起做了一些事情的缘故吧，我想感谢他们。

最后我想感谢我的家人。不论是以前还是现在以及未来，他们都无保留地给了我他们的爱。经常说的是为人父母之后才能体会到父母对子女的爱，但在还未到这一步的我已经能感受到这份爱意的深切与厚重。谢谢他们。

祝愿生活的每一天中都有过去、现在与未来。