

國立台灣師範大學生命科學系碩士論文

藉由族群遺傳分析與基因轉殖小鼠模式
探討 *TBP* 基因上 CAG 三核苷酸重複
序列對神經退化性疾病之影響

**Investigation of the neurodegenerative impact of
CAG expansion in *TBP* gene through
Taiwan neurodegenerative patients and
transgenic mouse model**

研 究 生：林 承 岳

Cheng-Yueh Lin

指導教授：謝 秀 梅 博士

Dr. Hsiu-Mei Hsieh-Li

李 桂 楨 博士

Dr. Guey-Jen Lee-Cheng

中 華 民 國 九 十 五 年 六 月

致 謝

這本論文的背後，是一部關於成長的故事，四年的光陰，不長也不短，但其中所隱含的意義，卻已非筆墨所能形容，感謝師大讓我擁有這樣成長的環境與表演的舞台。

本篇論文的完成，有賴許多老師的指導，首先我要感謝我的指導教授謝秀梅老師，您寬闊的心胸與專業的指導，讓我在研究上得心應手；感謝李桂楨老師，您深厚的學養與對我的提拔與肯定，我將終生感激。還要感謝羅榮昇醫師，給我寶貴的學習機會，以及提示我許多研究過程中的盲點。感謝陳瓊美醫師、吳逸如醫師提供臨床檢體以及在實驗上的協助。感謝呂國棟老師在行為實驗方面的大力幫忙與論文上的指導。感謝李鴻老師在基因轉殖方面所提供的協助，感謝陳儀莊老師在論文上所給予的諸多寶貴建議與指導。

在師大的四年，受到的指導與幫助非常多，首先我要感謝帶領我從門外漢進入分子生物研究領域的前輩們：馮漢中醫師、瑞宏學長、桂芬學姊、政光學長、慶孝學長、國保、玄原、淑明…，您們的教導是我最珍惜的禮物。感謝在 H2 lab 共同奮鬥的各位伙伴們：瓊琦學姊、志宏學長、慧貞學姐、雅津學姐、韋倫、立昉、雨霖、浚榕、馨慧、翎絢、大學部的與祥、峻緯、慈文、霽雲、宜昀、愉恬、佩靜…。感謝核心實驗室所有和我一同成長的夥伴們：麗卿學姐、秀觀學姐、欣杰學長、志信、怡辰、懿婷、玟璘、瑾妮、淑宜、宜欣、霽茹、芷英、士寰、襄銘、慧茹、若芸、郡潔、大學部的文凡、景勝、曉涵、于堯…。我會永遠珍惜這份實驗室的情誼！感謝動物房的管小姐和陸泉，讓我和我的小老鼠天天吃得飽，並享受最好的生活品質。還要感謝其他在實驗上或生活上友情贊助的好朋友們：哲維學長、柏安學長、淑寧學姐、芳足學姊、金祝、正康、鎮寬、伯寬、孟昌、民聰…。感謝大學同學怡嫻、怡君、吉堂、佐維、靖宇…，和你們的相處是我另一種動力的來源。當然還要感謝我親愛的葦苓，有妳的陪伴讓我能勇敢的面對一路上所遇到的挑戰！

最後，我要感謝一直默默支持我的家人們，感謝爸爸媽媽對我的體諒與支持，感謝姊姊、姊夫、妹妹、表弟們在生活上提供的協助與心情的調適，感謝各位姨婆與小阿姨佳華、佳琪平日的照顧。有您們做我的後盾，才能讓我無後顧之憂，勇往直前，我有今日的成果都應歸功於您們，謝謝您們！

於本人論文研究期間，感謝財團法人罕見疾病基金會提供獎助學金，
使本篇論文得以順利完成。

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VII
圖表次.....	IX
壹、緒論	
一、脊髓小腦運動失調症 (Spinocerebellar ataxia).....	1
二、小腦萎縮症之臨床病症及類型.....	1
三、小腦萎縮症之分生特徵.....	2
四、多麩醯胺酸擴增疾病 (Polyglutamine expansion diseases).....	3
五、第十七型脊髓小腦運動失調症 (SCA17).....	4
六、基因轉殖小鼠技術 (Transgenic mice).....	6
七、Purkinje cell.....	7
貳、研究目的.....	9
參、研究材料與方法.....	10
第一部份、TBP 基因 CAG 三核苷酸重複的族群遺傳分析	
一、血液樣品來源.....	10
二、基因組 DNA 的萃取.....	10
三、聚合酵素連鎖反應(PCR).....	11

四、	基因型分析 (Genotyping).....	11
五、	純化 DNA 片段.....	11
六、	接合反應 (Ligation).....	12
七、	轉型勝任細胞 (competent cell) 之製備.....	13
八、	細菌的轉形作用(transformation).....	13
九、	質體(plasmid)DNA 之小量製備.....	14
十、	DNA 定序 (sequencing).....	15
第二部份、建立 SCA17 疾病動物模式		
一、	<i>TBP</i> 基因轉殖重組質體之構築.....	15
二、	質體 DNA 的大量製備.....	16
三、	顯微注射 DNA 片段 (injection fragment) 之製備.....	17
四、	基因轉殖小鼠之建立.....	18
五、	基因轉殖小鼠之基因型分析.....	19
六、	南方墨漬法分析 (Southern blot analysis).....	20
七、	轉殖基因拷貝數定量 (Transgene copy number quantitation).....	20
八、	FVB 小鼠腦組織之總 RNA 萃取 (RNA extraction).....	21
九、	反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR).....	22
十、	總蛋白質萃取與西方墨漬法分析 (Western blot analysis).....	23

十一、實驗動物飼養.....	24
十二、行為測試 (Behavioral experiments).....	24
(1)自發性運動行為偵測 (Locomotor activity monitoring)...	25
(2)旋轉滾輪測試 (Rota-rod test).....	25
(3)抓力測試 (grip strengthen test).....	26
十三、免疫組織化學法 (Immunohistochemistry)分析.....	26
十四、統計方法 (Statistical analysis).....	28
肆、研究結果	
一、建立台灣不同族群 SCA17 <i>TBP</i> 基因 CAG 重複之遺傳資 料庫.....	29
二、SCA17 <i>TBP</i> 基因轉殖小鼠之建立.....	29
三、h <i>TBP</i> 基因在基因轉殖小鼠腦部之表現	
(1) RNA 之表現.....	31
(2) 蛋白質之表現.....	32
四、基因轉殖小鼠之行為檢測	
(1) clasping 行為觀察.....	33
(2) Locomotor 測試.....	33
(3) Rota-rod 行為測試.....	34
(4) Grip strengthen 測試.....	35

五、	基因轉殖小鼠之腦組織病理學分析.....	36
伍、	討論	
一、	<i>TBP</i> 基因 CAG 重複序列在台灣人族群中之分布情形...	39
二、	建立帶有人類 <i>TBP</i> 基因之基因轉殖小鼠.....	40
三、	人類 <i>TBP</i> 基因在基因轉殖小鼠腦中表現情況.....	42
四、	人類 <i>TBP</i> 基因轉殖小鼠行為上之異常現象.....	43
五、	人類 <i>TBP</i> 基因轉殖小鼠腦部受損情況.....	45
陸、	結論.....	48
柒、	參考文獻.....	50
捌、	附錄圖表.....	59

摘要

TATA binding protein (TBP) 為細胞中一種主要的轉錄因子，其
在主導基因轉錄的起始過程中扮演著重要的角色。人類 *TBP* 基因位
於染色體 6q27，其 5'端包含一段 CAG 三核苷酸重複序列，轉譯出的
蛋白質 N 端上會形成一段多麩醯胺(polyglutamine, polyQ) 的片段。
在神經退化性疾病研究中發現 TBP 功能異常與疾病的發生有關，包
括杭丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease, HD)、阿茲罕默氏症
(Alzheimer's disease, AD) 以及第十七型脊髓小腦運動失調症
(SCA17)。SCA17 為一種體染色體顯性遺傳之神經退化性疾病，屬於
眾多類型的脊髓小腦運動失調症 (SCA) 其中一型，臨床上患者有小
腦萎縮、吞嚥困難、智力退化、以及錐體外徑路 (extrapyramidal tract)
等症狀。目前已知 SCA17 致病原因與 *TBP* 基因之 CAG 重複序列擴
增有關，正常族群中重複次數為 31 到 42 個，患病者則擴增為 43 到
66 個。為探討 *TBP* 基因上 CAG 重複序列在台灣人族群中之分布情
況，我們針對正常人族群及不同類型的神經退化性病人進行 *TBP* 基
因型分析，結果發現在各族群中最常見之 CAG 重複個數為 36 個。此
外分別檢測出 4 位失智症 (Dementia) 患者與 2 位帕金森氏症
(Parkinson's disease, PD) 患者帶有擴增之等位基因 (allele)。為建立

SCA17 之動物模式，我們分別將帶有 36 與 109 個 CAG 重複之人類 *TBP* (*hTBP*) 基因，以 *pcp2/L7* 組織專一性啟動子大量表現於小鼠小腦的 Purkinje 細胞，目前成功建立 7 株基因轉殖小鼠。由分生分析中証實，轉殖的 *hTBP* 在基因轉殖小鼠體內均可正常表現。基因轉殖小鼠行為觀察實驗發現，*hTBP109Q* line-16 與 line-54 小鼠出現 clasping 症狀，line-54 與 line-69 更分別於 6 到 9 個月大時出現運動失調之症狀。經由 rota-rod 滾輪測試小鼠之運動能力發現，在 line-54 與 line-69 之基因轉殖小鼠，其平衡感與協調性表現明顯劣於非基因轉殖小鼠，而 *hTBP36Q* 之基因轉殖小鼠則未出現此一差異。由組織切片觀察中發現 *hTBP109Q* 基因轉殖小鼠之小腦 Purkinje 細胞確實有受損之情形。本篇論文之實驗結果一方面建立國人族群遺傳資料庫，另一方面建立 SCA17 疾病動物模式，提供後續致病機轉探討與臨床治療、篩檢藥物研究之利器。

Abstract

TATA binding protein (TBP) is a general transcription factor that plays an important role in initiation of transcription. *TBP* gene is located in chromosome 6q27 and contains a CAG/CAA trinucleotide repeats region in 5' end which encodes a polyglutamine tract. It was reported that TBP is involved in numerous neurodegenerative diseases including Huntington's disease (HD), Alzheimer's disease (AD) and spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17). SCA17 is an autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA). It has been known that the length of polyglutamine tract encoded by the CAA/CAG repeats is related to the disease progression. The range of CAG repeats of *TBP* gene is 31- 42 in normal population and 43 - 63 in SCA17 patients.

To investigate the *TBP* trinucleotide expansion effect on neurodegeneration, we conducted genotyping analysis in both normal and neurodegenerative disease populations in Taiwan. We found that the most common *TBP* allele contains 36 repeats. We identified six individuals with expanded CAG repeats from two families originally diagnosed as PD and Dementia, respectively.

To establish SCA17 disease animal model, we generate transgenic mice expressing the human *TBP* gene with either normal or expanded CAA/CAG tracts under the control of Purkinje cell-specific promoter, *Pcp2/L7* promoter. Seven transgenic mouse lines have been identified. The existence of transgene in the mouse genome was confirmed by Southern blot analysis. RNA and protein expressions were detected by

RT-PCR and Western blot analyses, respectively.

By behavior observation, we found that *hTBP*109Q line-16 and line-54 transgenic mice have a hind-limb clasping phenotype, which was also reported by Huntington's disease transgenic mice. Among the 7 transgenic lines, line-69 and line-54 showed significant reduction in the Rota-rod performance compared to their wild-type littermates. We also observe ataxia phenotype of these two lines in their elder stage. Immunohistochemical analysis has shown that the Purkinje cell in line-69 transgenic mouse cerebellum were lost severely.

In conclusion, we have successfully generated the *hTBP* transgenic mice as SCA17 animal model. This model should help us to gain insight about the role of TBP in neurodegeneration and eventually could lead to rational therapeutic protocol designing.

圖表次

附表一、SCA 基因.....	59
附圖一、基因轉殖小鼠之建立：原胚核顯微注射法流程.....	60
表一、基因型分析 PCR 放大引子及條件.....	61
表二、基因轉殖小鼠基因型分析 PCR 放大引子及條件.....	61
表三、 <i>TBP</i> 基因帶有三核苷酸序列異常擴增病患之定序結果.....	62
表四、 <i>hTBP</i> 各基因轉殖小鼠株所帶有之轉殖基因套數.....	62
表五、 <i>hTBP</i> 基因轉殖小鼠飼育數量統計表.....	63
圖一、 <i>hTBP</i> 基因轉殖質體.....	64
圖二、 <i>hTBP</i> 基因轉殖質體之 DNA 片段定序圖.....	65
圖三、顯微注射片段酵素切割示意圖與電泳圖.....	66
圖四、南方墨漬法探針示意圖.....	67
圖五、FVB 小鼠之 Rota-rod 常模.....	67
圖六、台灣不同族群 SCA17 <i>TBP</i> 基因 CAG 重複序列基因型分析 圖.....	68
圖七、 <i>hTBP</i> 基因轉殖小鼠基因型分析與南方墨漬法分析結果.....	69
圖八、 <i>hTBP</i> 基因轉殖小鼠轉殖基因拷貝數 (copy number) 定量之聚 合酵素鏈反應 (PCR) 電泳圖.....	70
圖九、 <i>hTBP</i> 基因轉殖小鼠 RT-PCR 實驗結果.....	71

圖十、基因轉殖小鼠西方墨漬法分析結果.....	72
圖十一、hTBP 基因轉殖小鼠 clasping 行為照片.....	72
圖十二、hTBP109Q line-69 行為分析結果.....	73
圖十三、hTBP36Q line-35 行為分析結果.....	74
圖十四、hTBP109Q line-16 行為分析結果.....	75
圖十五、hTBP109Q line-54 行為分析結果.....	76
圖十六、hTBP 基因轉殖小鼠小腦組織切片 Nissl stain 結果.....	77
圖十七、15 個月大之 hTBP 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 結果.....	78
圖十八、hTBP 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 圖.....	79
圖十九、三個月大之 hTBP 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 圖.....	80

壹、緒論

脊髓小腦運動失調症 (Spinocerebellar ataxia)

脊髓小腦運動失調症 (Spinocerebellar ataxia ; SCA)，一般簡稱為小腦萎縮症，為一群體染色體顯性遺傳的神經退化疾病，所以只要帶有 SCA 致病之任一等位基因 (allele)，一生中就可能發病的機會。由於常在中晚年才發病，所以容易將 SCA 致病基因遺傳至子代中。小腦萎縮症成因可能是小腦內的神經細胞退化或萎縮，而小腦和行動協調性有關，所以小腦萎縮症病人常有行動失調、步履蹣跚等共同症狀。目前小腦萎縮症仍無任何根治的方法，僅能利用藥物或物理治療減輕其症狀 (Schols et al., 2004)。

小腦萎縮症之臨床病症及類型

目前已被報導之小腦萎縮症多達 26 型，分別是 SCA1~8，SCA10~23，SCA25~28 (Cagnoli et al., 2006)。雖然大多數小腦萎縮症僅知其致病基因在染色體上之定位，僅有部分已知小腦萎縮症之致病基因與其致病範圍已被分析，包括 SCA1~3，SCA6~8，SCA10，SCA12，SCA17 等型 (Brusco et al., 2004) (附表一)，其中 SCA3 是

台灣最常見的一種小腦萎縮症 (Soong et al., 2001)。由於各型小腦萎縮症之臨床症狀有許多相似處，如步態失調與發音障礙等，所以很難從臨床症狀來區分，必須進一步作分子層次之診斷。此外，各型小腦萎縮症有其典型症狀，以發病年齡為例，SCA1~3 在青年期就發病，SCA6 多在中年期 (Maschke et al., 2005)，而 SCA7、SCA13 則提早至孩童期 (Hsieh et al., 2000; Waters et al., 2005)。至於 SCA17，除了一般共同症狀外，另會出現智力退化的情形 (Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Zuhlke et al., 2001)。

Harding 根據臨床上症狀的分類，將體染色體顯性遺傳的小腦性運動失調症 (autosomal dominant cerebellar ataxia，簡稱為 ADCA) 分為三大類：第一型 (ADCA I) 包含小腦的症狀及其他中樞神經系統的症狀，如錐體 (pyramidal) 及錐體外 (extrapyramidal) 徑路神經發生問題等。屬於 ADCA I 的有 SCA1~4、SCA8、SCA12 與 SCA17 等；第二型 (ADCA II) 除了小腦的症狀外，還有視神經上的一些退化的症狀，導致病人會有失明的可能，ADCA II 包含了 SCA7；第三型 (ADCA III) 則純為小腦的症狀，有 SCA5、SCA6、SCA10、SCA11、SCA14 等型 (Harding, 1993)。

小腦萎縮症之分生特徵

小腦萎縮症在分子層次上有一個共同點，除了 SCA10 之外（其為 ATTCT 五核苷酸重複的擴增），在致病基因中都含有一段三核苷酸重複（trinucleotide repeat），此三或五核苷酸重複次數為一多型性變異，當重複次數超出一定範圍時，病人就會致病。大部分類型的小腦萎縮症是以三核苷酸 CAG 為重複單位，CAG 可控制麩醯胺（glutamine，簡稱 Q）的合成，所以經由轉錄（transcription）、轉譯（translation）出的蛋白質產物會包含一段多麩醯胺鏈片段（poly-Q tract），這種帶有過長 poly-Q tract 的蛋白質可能會對神經細胞造成一些毒害，最後產生運動失調等症狀（Perez et al., 1998; McCampbell et al., 2000; Yamada et al., 2001）。

多麩醯胺酸擴增疾病 (Polyglutamine expansion diseases)

在三核苷酸重複序列擴增疾病（trinucleotide repeat expansion disease）之中，可概分為兩大類，一大類是擴增序列位於非轉譯區（untranslated region, UTR），如肌強直萎縮症（Myotonic dystrophy, DM）(Strong and Brewster, 1997)、小腦萎縮症第 8 型（Koob et al., 1999）與第 12 型（Holmes et al., 1999）。另一大類則是位於轉譯區，在致病蛋白質中會包含有一段多麩醯胺（polyQ）擴增片段，因此這類疾病又

被稱為多麩醯胺擴增疾病 (polyglutamine expansion disease)。目前已知至少有 9 種由含有擴增 polyQ 蛋白質所導致之疾病，包括脊髓延髓肌肉萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA)、杭丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease, HD)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral pallidoluysian atrophy, DRPLA) 以及六種脊髓小腦運動失調症 (SCA1~3、6、7、17) (Zoghbi and Orr, 2000)，雖然這些疾病致病蛋白質均不相同，且大部分致病機轉尚未完全了解，但卻擁有許多共同的特性，例如在疾病遺傳上均屬於顯性遺傳疾病，且受損之區域都集中於中樞神經系統部分 (Ross, 2002)；此外，當 poly-Q 愈長時會導致發病的時程提早 (Morfini et al., 2005)。

第十七型脊髓小腦運動失調症 (SCA17)

近年來各種不同型的脊髓小腦運動失調症不斷的被報導出來，其中 SCA17 被發現和 TATA-box binding protein (*TBP*) 基因上的 CAG 三核苷酸重複序列擴增相關 (Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001)。*TBP* 基因位於染色體 6q27 的位置，encode 一轉錄起始因子，其序列上包含有一段參雜有 CAG/CAA 的重複序列，經過轉錄轉譯後會形成一段多麩醯胺 (polyglutamine) 的片段，此片段的長度在族群中具多型性變化 (Gostout et al., 1993; Imbert et al., 1994)。Koide 等人

在 1999 年首先報導了一個 *TBP* 基因上含有 63 個 CAG 重複的日本家族出現有漸進式的神經性退化病症 (Koide et al., 1999)。之後的不同族群的遺傳分析顯示，*TBP* 基因的 CAG 重複數目在正常人中約從 31 到 42 個，而 43 到 66 個 CAG 重複會產生運動失調與認知方面的缺失 (Fujigasaki et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Zuhlke et al., 2001; Silveira et al., 2002; De Michele et al., 2003; Hernandez et al., 2003; Maltecca et al., 2003; Reid et al., 2003; Rolfs et al., 2003; Zuhlke et al., 2003)。除了漸進性的神經退化性病徵之外，SCA17 病人也會出現有 seizure、失智、精神病症狀以及錐體外特徵等 (Koide et al., 1999; Fujigasaki et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Zuhlke et al., 2001; Silveira et al., 2002; De Michele et al., 2003; Maltecca et al., 2003; Rolfs et al., 2003; Zuhlke et al., 2003)。TBP 是細胞進行轉錄過程的轉錄因子之一，在所有細胞中均會表現。由於 *TBP* 基因上的 CAG/CAA 重複序列會使其蛋白質產物上含有多麩醯胺酸片段，其特性與 SCA1~3、SCA6、SCA7、DRPLA 及 HD 等神經退化性疾病相似。特別的是，目前分析已知人類的 *TBP* 基因中 CAG 序列重複次數有大部分為 36 或以上，已達其他多麩醯胺擴增疾病致病範圍。除小腦萎縮症病患外，亦有學者發現某些類似杭丁頓氏舞蹈症的病患其 *TBP* 基因有不正常擴增的情形 (Stevanin et al., 2003; Bauer et al., 2004)。在 *in vitro* 研究方面，Reid 等人成功建立出 SCA17 細胞模式，發現在含有不正

常 CAG 擴增 *TBP* 基因所產出的 TBP 會有 gain of function 的功能異常，在細胞中觀察到有包含體 (intracellular inclusion) 產生 (Reid et al., 2003)。

基因轉殖小鼠技術 (Transgenic mice)

將基因送入細胞內觀察其功能表現，遠不如將基因直接送入受精卵或胚胎裡，從活體中研究此基因在發育過程之功能與調控機制。由於小鼠具有多年的研究基礎，加以其配種、育種及發育過程所需的技術已臻成熟，再加上培育時間不長等特性，使得基因轉殖小鼠的建立，已成為研究特定基因功能表現之最佳選擇。早在 1970 年初，由於病毒培養的成功，Jaenisch 等人利用 SV40 (Simian virus 40) DNA 注射至小白鼠囊胚腔 (blastocyst) 中，再將胚胎植入代孕母鼠子宮內，而發育成功之小鼠可謂為基因轉殖鼠的先驅 (Jaenisch and Mintz, 1974)，此鼠有 40% 的成體細胞嵌有 SV40 之 DNA，呈雜嵌性 (mosaic)，且嵌入之 DNA 已可複製分送至子代細胞及子代鼠中承傳下去。目前基因工程及顯微技術之精進，可將不同物種且長度不同的純化 DNA，利用管尖極細的玻璃微量注射針，以顯微注射 (microinjection) 的技術注入受精卵中較大之雄性原胚核 (male pronuclei)，便可製造出基因轉殖小鼠 (附圖一)。

基因轉殖小鼠技術已被廣泛應用於建立疾病模式之研究上，其中神經退化性疾病之相關研究為主要範疇之一。目前已建立基因轉殖小鼠模式之神經退化性疾病包括有 Alzheimer's disease、Huntington's disease、SBMA、SCA1~3、SCA7 與 DRPLA 等 (Burright et al., 1995; Ikeda et al., 1996; Schilling et al., 1999; Yvert et al., 2001; Higgins and Jacobsen, 2003; Katsuno et al., 2003; Aguiar et al., 2006)。

Purkinje cell

Purkinje cell 是小腦主要負責訊號輸入與輸出的細胞，在脊髓小腦運動失調症病人臨床病理上，常會觀察到有 Purkinje cell 退化萎縮的病徵，因此 Purkinje cell 的受損很可能與 SCA 的病症形成有關。Purkinje cell 主要接受 GABA 與 glutamate 等神經傳導物質的刺激 (Baader and Schilling, 1996)。Purkinje cell 中會專一性產生一種蛋白質稱為 Purkinje cell protein 2 (pcp2/L7)，從胚胎發育到第 16 天的老鼠 (E16) 胚胎中作 Purkinje cell 的初級培養 (primary culture) 中，可利用這個蛋白質的免疫染色將 Purkinje cell 與其他神經細胞區分出來 (Oberdick et al., 1988; Dunn et al., 1998)。隨著 Purkinje cell 的軸突發育，則可針對另一個 Purkinje cell specific marker-calbindin (Wanner et

al., 1997) 進行免疫染色，觀察其軸突的型態。1997 年 Mohn 等學者建立 *pcp2* 基因剔除小鼠，但並未發現有 Purkinje cell 生長發育或功能的異常，推測可能有其他與 *pcp2* 功能相似的蛋白質可彌補其缺失 (Mohn et al., 1997)。2001 年 Zhang 等人利用 *pcp2/L7 promoter* 建立 EGFP 基因轉殖小鼠，發現可以成功的在 Purkinje cell 專一表現綠螢光蛋白，並可在小鼠出生當天 (P0) 的小腦表面看到微弱的綠色螢光 (Zhang et al., 2001)。因此 L7 promoter 之後就被利用在許多需要專一性在小腦的 Purkinje cell 表現特定蛋白的研究當中，本研究中亦採用 *pcp2/L7 promoter* 進行基因轉殖小鼠之建構。

貳、研究目的

本篇研究主要有兩個方向，首先在族群遺傳方面，由於不同人種之間的基因多型性狀況會有所差異，因此我們針對台灣地區正常人族群與神經退化性疾病族群進行 *TBP* 基因多型性分析，藉瞭解台灣人族群中 *TBP* 基因 CAG 三核苷酸重複序列擴增的分布及擴增情形，來建立國人之遺傳資料庫。另一方面，利用原胚核顯微注射 (pronuclei microinjection) 的技術將含有不同 CAG 擴增的人類 *TBP* 基因轉入小鼠基因體 DNA 中，產生帶有該基因之基因轉殖小鼠，藉由 *pcp2/L7* promoter 的驅動使致病 TBP 專一性表現於小腦 Purkinje cell 中，並分析其基本運動功能之改變以及腦組織受損情況，以建立研究 SCA17 疾病之動物模式，作為日後致病機制探討或藥物篩檢與疾病治療方面的研究工具。

參、研究材料與方法

第一部份、*TBP* 基因 **CAG** 三核苷酸重複的族群遺傳分析

一、 血液樣品來源

經臨床醫師診斷屬於運動失調 (Ataxia)、帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD)、失智症 (Dementia)及其他類型神經退化性疾病患者及正常人之血液樣品採集，均取得病人或其家屬同意，由林口長庚紀念醫院神經內科醫師提供。

二、 基因組 DNA 的萃取

基因組 DNA 的萃取係採用 STRATAGENE DNA Extraction Kit。將 2~5 ml 的全血置於 15 ml 的離心管中，加入 Solution 1 至 15 ml，翻轉數次使之混合均勻。靜置於冰上 2 分鐘後，以 2,000 rpm 離心 5 分鐘以沉澱細胞核。去除上清液，加入 2 ml Solution 2 震盪以懸浮沉澱之細胞核。再加入 2 μ l 之 Pronase，於 37°C 作用隔夜或數天。待 Pronase 反應完成後，先置於冰上 10 分鐘，再加入 Solution 3，翻轉數次使之混勻後置於冰上 5 分鐘。再以 3,400 rpm 離心 15 分鐘，取上清液，加入 6 μ l RNase。置於 37°C 水浴 15 分鐘後，加入 2.5 ml 的異

丙醇，翻轉數次直至 DNA 析出。將析出之 DNA 挑至另一 1.5 ml 離心管，以 70%酒精洗去 DNA 析出物中的鹽類，風乾後溶於適量的 ddH₂O。以 OD₂₆₀ 吸光值測定 DNA 濃度，稀釋成 50 ng/μl 後置於 4°C 冰箱備用。

三、 聚合酵素連鎖反應(PCR)

取 100 ng 的基因組 DNA，置於 25 μl 的 PCR 反應中，用以放大包含有三核苷酸重複的片段。所需的引子與條件列於（表一）。PCR 反應以熱循環儀 (OmniGene，HYBAID) 進行，之後以 1.8%洋菜膠體電泳檢查片段大小。

四、 基因型分析 (Genotyping)

取 1 μl 的 PCR 產物，以 1：8 比例用水稀釋，再以聚丙烯酰胺膠體進行基因型分析 (MegaBACE 500，Amersham Biosciences Ltd.) (國立臺灣師範大學遺傳多樣性實驗室)，並利用 MegaBACE Analyzer 軟體分析比對基因型，推算出三核苷酸重複次數。

五、 純化 DNA 片段

自 PCR 放大患者的 SCA17 致病基因片段，經含 EtBr (0.25 $\mu\text{g/ml}$) 的 1.8% 洋菜膠電泳分離後，於紫外光下取出所要的片段，置於 1.5 ml 離心管中，進行膠體純化 (Gel extraction kit, Viogene)。方法如下：加入 GEX buffer (500 μl /50 ~ 300 mg 膠體) 後置於 60°C 乾浴器中 10 分鐘，待膠體溶解，再將溶液移至純化用之管柱內，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。除去離心下來之液體，加入 500 μl wash I buffer 至管柱中，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。除去離心下來之液體，加入 700 μl wash II buffer，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉離心下來的液體，加入 700 μl 的 70% 酒精並以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，接著倒掉離心下來的液體，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘後，將管柱移至另一 1.5 ml 離心管中，加入 30 μl 的 ddH₂O，於室溫下靜置 10-30 分鐘，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，即完成純化的工作。最後取 2 μl 純化後的 DNA，以 1.8% 洋菜膠體進行電泳檢查。

六、 接合反應 (Ligation)

在一 5 μl 接合反應中，取 0.5 μl (50 ng) pGEM-T Easy 載體 (Promega)，加入適量上述純化的 DNA 片段、0.5 μl (3U) T4 DNA ligase 及 0.5 μl 10X buffer (300 mM Tris-HCl pH7.8 – 100 mM MgCl₂ – 100 mM DTT – 10 mM ATP)，混合均勻後置於 16°C 作用隔夜，待隔日作

用完成後將反應置於熱循環儀中以 70°C 作用 10 分鐘，終止 T4 DNA ligase 作用，並迅速置於冰上。

七、 轉型勝任細胞 (competent cell) 之製備

接種大腸桿菌 TOP-10F' (Invitrogen) 一個菌落到 1 ml 含四環黴素 (15 µg/ml) 之 Luria Bertani (簡稱 LB) 培養液中 (1% tryptone – 1% NaCl – 0.5% yeast extract)，於 37°C、250 rpm 震盪隔夜培養後，倒入 100 ml LB 培養液中繼續培養 3 ~ 4 小時 ($OD_{600}=0.5 \sim 0.6$)。置於冰上 10 分鐘後，以 4°C、3,000 rpm 離心 5 分鐘沉澱細胞。倒除上清液，再加入 20 ml 預冷過濾之 0.1 M $CaCl_2$ 以懸浮細胞。冰浴 10 分鐘後，以 4°C、3,000 rpm 再離心 5 分鐘沉澱細胞。倒除上清液，加入 2.5 ml 含 16% 甘油之 0.1 M $CaCl_2$ ，輕敲管壁以懸浮細胞，即完成可用之轉形勝任細胞。分裝成每管 100 µl 後，測定期轉形效率達 1×10^7 菌落/µg pGEM4 DNA 以上，即可置於 -70°C 保存備用。

八、 細菌的轉形作用(transformation)

將保存於 -70°C 之轉形勝任細胞 (competent cells) 置於冰上解凍，在 100 µl 的細胞中加入 5 µl 前述已完成接合反應之重組質體

DNA，混合均勻後置於冰上 30 分鐘；再置於 42℃ 水浴中熱休克 45 秒。置冰上 2 分鐘後加入 900 μ l LB 培養液，於 37℃ 中培養 40 分鐘到 1 小時。再加 100 μ l 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal，20 mg/ml in dimethylformamide) 及 100 μ l isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG，200 mg/ml)，混合均勻後各吸取 200 μ l 至每盤含 50 μ l/ml 青黴素 (ampicillin) 之 LB 培養基中，以滅過菌的玻棒將菌液塗抹均勻，培養 16 ~ 18 小時。

九、質體 (plasmid) DNA 之小量製備

以牙籤挑選出前述轉形作用生長出的白色單一菌落，劃在含青黴素之培養基中保留菌種，同時並置於含青黴素的 1 ml 培養液的 1.5 ml 離心管內，於 37℃、250 rpm 震盪培養 6 ~ 8 小時或隔夜後，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，除去上清液。以鹼性溶菌法分解細菌，抽取質體之 DNA。其方法如下：加入 70 μ l solution I (50 mM glucose – 25 mM Tris-HCl pH8.0 – 10 mM EDTA pH8.0)，劇烈震盪以懸浮菌液；再加入 140 μ l 新鮮配置的 solution II (0.2 N NaOH – 1% SDS)，輕微地翻轉離心管數十次之後，加入 105 μ l solution III (3M potassium acetate)，再輕微地翻轉離心管數十次後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，即可見白色的核酸沉澱物。去除上清液，以 70% 酒精洗去多餘的鹽類。風乾後，

加入 30 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 ddH₂O 於沉澱物中，37°C 水浴至少 10 分鐘助核酸溶解，最後取 2 μ l 進行 0.7% 洋菜膠體電泳分析。挑選出有插入 DNA 片段的質體後，進一步以限制酵素檢查其插入片段是否正確。

十、 DNA 定序 (sequencing)

挑選出成功插入 DNA 片段的質體進行定序 (MegaBACE 500, Amersham Biosciences Ltd.) (國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)，以直接計算其三核苷酸重複次數，並比較是否與 Genotyping 分析結果符合。

第二部份 建立 SCA17 疾病動物模式

一、 *TBP* 基因轉殖重組質體之構築

帶有不同 CAG 擴增數目之人類 *TBP* cDNA 片段由李桂楨老師實驗室所提供，計有含 36 個 CAG 重複之正常人 *TBP* cDNA，以及達致病範圍含有 109 個 CAG 擴增片段之 *TBP* cDNA；利用基因工程將此段基因構築在 pc2/L7 promoter 下游，並在 cDNA 下游接上 SV40

poly-A 片段（圖一）；過程簡述如下：將原先構築於 pGEM-T 上之人類 *TBP* cDNA 以 *NotI* 切下，純化含人類 *TBP* cDNA 之片段，pcp2/L7 promoter 與 SV40 poly-A 片段已構築於 pCEV 質體上，pCEV 質體由中央研究院李鴻老師實驗室所提供。將純化後之人類 *TBP* cDNA 片段與同樣以 *NotI* 切割純化後之 pCEV 質體片段進行接合反應，將質體藉由細菌轉形作用 (Transformation) 轉入轉形勝任細胞 (Competent cell) 內，挑選單一菌落進行質體小量萃取，並以限制酶切割檢查，選殖帶有成功接合質體之菌落，進行質體的複製與保存。構築好之質體均經過定序確認接點區域之序列與 CAG 重複個數均正確無誤（圖二）。

二、 質體 DNA 的大量製備

經限制酶分析與定序確認之重組質體菌落培養於含青黴素的 1 ml 培養液中，37°C、250 rpm 震盪培養 2 小時以上，倒入 65 ml 含青黴素的培養液，繼續培養 20 小時。之後利用 Viogene Ultrapure Plasmid Midiprep System (Midiprep-V100) 進行質體 DNA 的大量製備及純化。方法為：將 65 ml 的菌液均分裝於兩個 50 ml 的有蓋離心管中，以 8,000 rpm 離心 5 分鐘，棄除上清液後每管加入 2 ml 的 buffer VP1 並劇烈震盪以懸浮細菌，將兩管打散的菌液合併為一管，加入 4 ml

的 buffer VP2，溫和的翻轉離心管數十次，再加入 4 ml 的 buffer VP3，翻轉離心管數十次後於冰上作用 5 分鐘。之後利用 12,000 rpm 離心 20 分鐘，離心時將 Midiprep-V100 column 置於 50 ml 新的離心管中，加入 5 ml 的 buffer VP4，經重力作用讓溶液通過管柱後棄去濾液。之後將前述離心後的上清液倒入 Midiprep-V100 column 中，經重力作用讓菌液通過管柱後棄除濾液，再以 12 ml 的 buffer VP5 清洗管柱，亦利用重力作用讓菌液通過管柱後棄除濾液。之後將管柱移至另一個新的離心管中，加入 5 ml 的 buffer VP6，利用重力讓溶液通過管柱將 DNA 沖洗出，即得含有質體 DNA 的沖洗液。再加入 3.75 ml 的異丙醇溫和的混合後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，即可看到白色的 DNA 沉澱物。去除上清液，加入 400 μ l 的 ddH₂O 溶解 DNA，並加入 20 μ l 的 5 M NaCl 及 2 ~ 3 倍體積之 100%酒精，混合後轉移至 1.5 ml 微量離心管，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘以沉澱質體 DNA，再以 70%酒精清洗鹽類。風乾後將 DNA 溶於 400 μ l 的 ddH₂O 中，以 OD₂₆₀ 吸光值測定 DNA 濃度，即完成質體 DNA 的大量製備。

三、 顯微注射 DNA 片段 (injection fragment) 之製備

將構築好之 *TBP* 基因轉殖質體以設計好之 *Sph*I 與 *Bam*HI 兩種限

制酵素進行切割，將包含啓動子、*TBP* 基因與 SV40 poly-A 的片段切出（圖二），限制酶切割反應過程如下：取 10 μg 之質體 DNA，進行總體積 100 μl 切割反應，置 37°C 水域槽中反應隔夜，取 4 μl 進行 0.8% 洋菜膠體電泳分析，確定限制酶切割反應完全（圖三）。

四、 基因轉殖小鼠之建立

限制酶切割反應完全之 DNA 片段送請長庚大學基因轉殖鼠核心實驗室進行原胚核顯微注射 (pronuclear microinjection)，原核胚顯微注射流程如（附圖一），茲簡述如下：顯微注射前三天，須先進行 FVB 母鼠之超排卵處理，以腹腔注射方式給予 PMSG (5 IU/隻)，兩天（48 小時）後再給予 HCG (5 IU/隻) 腹腔注射，於注射當晚置入野生型 FVB 具生育能力之公鼠與母鼠交配，以利隔天取得具原核之受精卵，並同時將已結紮過之 ICR 公鼠置入 ICR 母鼠籠中進行交配，作為假懷孕代理孕母 (pseudopregnant foster mothers) 之用。進行顯微注射操作當天上午檢查母鼠陰道栓 (plug) 有無，以確定交配成功；於上午 10:00~11:00 之間將 FVB 母鼠犧牲，取出輸卵管置於 M2 液體培養基中，以解剖針劃開輸卵管膨大部取出受精卵，置入含玻尿酸 (hyaluranidase) 之 M2 液體培養基中迅速洗去包覆於受精卵外之卵丘細胞 (cumulous cell) 組織，將洗淨之受精卵置於 M2 液體培養基中備

用。顯微注射於倒立式顯微鏡下以機器手臂進行操作，所使用之 DNA 濃度為 1 ng/ μ l，於雄核與雌核尚未結合前將 DNA 片段注入雄核中，完成注射後之胚胎須先置入 M16 液體培養基中培養，待胚胎分裂後，取出檢查有陰道栓之 ICR 母鼠進行胚胎殖入手術 (implantation)，將已分裂之胚胎殖入代理孕母子宮內發育，約經過三週 (20 天) 後小鼠出生，出生後小鼠約三週左右離乳，即可進行小鼠之基因型檢測。

五、 基因轉殖小鼠之基因型分析

分別在 *pcp2/L7* promoter 以及人類 *TBP* cDNA 序列上設計引子 (表二)，並確定該引子對可自小鼠基因組 DNA 中檢測出外來轉殖基因；小鼠出生後三週，取 0.5 公分的小鼠尾巴，進行基因組 DNA 萃取，流程如下：加入 200 μ l tail solution (50 mM EDTA, 1% SDS 50 mM Tris-HCl PH8.0, 100 mM NaCl, 0.35 mg/ml proteinase K) 並在 tail solution 中將尾巴剪碎，於 65°C 作用 4~5 個小時後，加入 80 μ l 5 M potassium acetate 劇烈震盪，於 4°C 靜置 1 小時。以 12,000 rpm 離心 30 分鐘，吸取上清液 (200 μ l) 加入 500 μ l 純酒精析出 DNA，利用玻璃毛細管 (glass microtube) 輕攪讓 DNA 黏附於毛細管上，以 70% 酒精沖洗後常溫風乾，再用適量的水將 DNA 溶出。將充分溶解後之 DNA 利用上述引子對以聚合酵素連鎖反應 (PCR) 方式檢查小鼠的

基因型，以確定小鼠是否帶有轉殖的人類 *TBP* 基因。

六、 南方墨漬法分析 (Southern blot analysis)

將小鼠基因組 DNA 以 *EcoRV* 限制酵素進行切割反應，以 0.8% 洋菜膠電泳分離 DNA 片段。選擇 *TBP* 基因上 CAG 三核苷酸重複序列 5 端之後一段 517 bp 片段作為探針 (probe)，以逢機引子法製作探針，使探針上帶有放射性 [α - 32 P]dCTP，作為雜合與偵測訊號之工具 (圖四)。

七、 轉殖基因拷貝數定量 (Transgene copy number quantitation)

基因轉殖小鼠所含之轉殖基因拷貝數 (copy number) 以聚合酵素連鎖反應 (PCR) 進行定量，假設小鼠基因組 (genome) 中共含有 3×10^9 bp DNA，分別計算帶有不同拷貝數時轉殖基因之含量，進行 PCR 定量，公式如下：

$$\frac{\text{mass of transgene DNA}}{50 \text{ ng genomic DNA}} = \frac{N \text{ bp transgene DNA}}{3 \times 10^9 \text{ bp genomic DNA}}$$

由於每次 PCR 反應所使用之基因組 DNA 為 100 ng，而基因轉殖小鼠

通常為半合子 (hemizygous)，因此公式中以 50 ng 為基準量進行計算。N 表示轉殖基因 DNA 之長度，以帶有 36 個重複序列人類 TBP 之質體而言，轉殖基因片段長為 2158 bp，由公式可推算出帶有一套轉殖基因等同於 50 ng 基因組 DNA 中含有 3.6×10^{-2} pg 之轉殖基因 DNA，而帶有 109 個重複序列人類 TBP 之質體其轉殖基因片段長為 2377 bp，即等同於 50 ng 基因組 DNA 中含有 3.9×10^{-2} pg 之轉殖基因 DNA，依此推算帶有 1、10、50 套轉殖基因時所含之轉殖基因 DNA 量，並以現有之基因轉殖重組質體製作稀釋管，與等量之野生型 FVB 小鼠基因組 DNA 混合，作為定量拷貝數之依據。取各基因轉殖株之小鼠基因組 DNA 與標準濃度之稀釋管同時進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)，所使用之引子對與反應條件如（表二）。

取 PCR 產物進行洋菜膠體電泳分析，並以標準管之 PCR 產物繪出標準曲線，換算出各基因轉殖株所帶有之轉殖基因拷貝數。

八、 FVB 小鼠腦組織之總 RNA 萃取 (RNA extraction)

將小鼠犧牲，取出大腦與小腦組織，分別置入 Trizol (Sigma) 中（小腦加入 700 μ l，大腦加入 1,000 μ l），依序以 18G 及 25G 之針頭抽吸組織至均質為止，置於室溫中反應 5 分鐘。分別加入氯仿 (chloroform)（小腦加入 140 μ l，大腦加入 200 μ l）混合均勻，室溫下

反應 3 分鐘。於 4°C 下以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，取上部水層，移入新的 eppendorf 中，加入 0.5 ml 異丙醇 (isopropanol) 均勻混合，置於 -20°C 反應 1 小時以上。於 4°C 下以 14,000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液，加入 1 ml 70% 酒精清洗沉澱物 (pellet)，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，置室溫下風乾。加入 DEPC 水（小腦加入 50 μ l，大腦加入 70 μ l），待 RNA 充份溶解後以分光光度計測 OD₂₆₀ 吸光度進行定量。

九、 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)

將定量後之 RNA，各取 500 ng 利用 SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen) 進行反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)。先在 10 μ l 的反應中加入 500 ng RNA、10 mM dNTP 1 μ l、oligo (dT)₂₀ primer 1 μ l，再補 DEPC-H₂O 至 10 μ l。在 65°C 下反應 5 分鐘後置冰上 1 分鐘以上，再加入 2 μ l 10X RT buffer、4 μ l 25 mM 的 MgCl₂、2 μ l 0.1 M DTT、1 μ l RNase OUT 及 1 μ l SuperScript III (共 10 μ l) 混合均勻，經 50°C 反應 50 分鐘再行 85°C 5 分鐘後，加入 RNase H 1 μ l 在 37°C 水浴槽中反應以分解 RNA，之後取適量 cDNA 及引子對作 PCR 反應，以檢測 RNA 表現情形。PCR 所使用之引子與條件同表一，並以 mouse β -actin 作為 PCR 之控制組，引子序列如（表二）。

十、 總蛋白質萃取與西方墨漬法分析 (Western blot analysis)

將帶有人類 *TBP* 轉殖基因之小鼠犧牲，分別取出大腦與小腦組織，萃取總蛋白 (total protein)：將組織加入適量 RIPA buffer，於冰上將組織以均質機 (polytron) 研磨至均質，置 4°C 以 1,200 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液，即完成總蛋白之萃取，最後加入適量 sample buffer，沸水浴 5 分鐘，冰於 -80°C 保存。經過 Bio-Rad protein assay kit 定量後，取等量 protein 進行 SDS-聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE) 分析，以 12% 聚丙烯醯胺膠體分離蛋白質，並轉漬到硝化木纖維紙 (NC membrane) 上。以 anti-TBP antibody (N-12; Santa Cruz) 分析大腦與小腦組織中轉殖人類 *TBP* 基因之蛋白質表現情形，抗體稀釋比例為 1：500，同時使用 Can Get Signal (Toyobo) 稀釋緩衝溶液進行抗體之稀釋。此外，由於該抗體 (N-12) 辨識 TBP 之 N 端，此段序列於小鼠 TBP 與人類 TBP 中呈現高度保留性，因此可同時檢測轉殖基因所表現之人類 TBP 與小鼠內生性 TBP，進而比較小鼠腦中內生性與外來轉殖之 TBP 表現量，並利用人類 SK-N-SH 細胞株之細胞萃取物 (cell lysate) 做為正控制組，另外以 actin (Chemicon) 作為蛋白質樣品 loading 之控制組。

十一、 實驗動物飼養

本實驗使用 FVB 品系小鼠，基因轉殖小鼠來自長庚大學基因轉殖鼠核心實驗室，其餘供行為常模測試與飼育繁殖之實驗小鼠購自國立台灣大學實驗動物中心，實驗期間小鼠均飼養於國立台灣師範大學生命科學系動物房內，以獨立通氣式無菌飼育籠架 (IVC, 樂斯科生物科技股份有限公司) 進行飼養，飼養籠中隨時提供足量飼料及飲水，動物房光照週期採 12 小時光照，12 小時黑暗，24 小時自動溫濕調控，室溫維持於 21~24℃，濕度維持於 45~70%，實驗操作全程於無菌操作台內進行，所有行為實驗均於動物之光週期中進行。本研究所採用之研究方法經由國立台灣師範大學實驗動物管理委員會審核通過後進行，並符合農委會所訂定之實驗動物使用規章。

十二、 行為測試 (Behavioral experiments)

將基因轉殖小鼠與野生型 FVB 小鼠交配進行繁殖，經基因型分析後取得帶有轉殖基因與不含有轉殖基因之小鼠，進行行為測試。測試項目分為自發性運動行為 (locomotor activity monitoring)、旋轉滾輪 (rota-rod) 和抓力測試 (grip strengthen) 三項。各實驗操作方法與目的如下：

(1) 自發性運動行為偵測 (Locomotor activity monitoring)

本行為測試主要目的在分析小鼠之基本活動能力及自發性的探索行為，作為後續行為實驗之基礎。實驗器材與操作方法如下：將小鼠放入 42 cm × 42 cm × 36 cm 黑色壓克力箱之底部中央，透過壓克力箱正上方裝設的小型直立式攝影機拍攝並同時記錄小鼠於箱內之水平移動情形。藉由 Etho Vision video tracking system 設備 (Etho Vision ; Noldus, NED)，以每秒拍攝定位六次紀錄動物中心點的水平位置變化，資料可直接傳輸至電腦螢幕，藉以觀察老鼠之水平移動軌跡，並利用軟體內建程式運算老鼠水平移動距離 (distance of horizontal movement)。實驗中，每 5 分鐘統計一次老鼠水平移動距離，連續記錄 15 分鐘。

(2) 旋轉滾輪測試 (Rota-rod test)

Rota-rod 主要使用於測試小鼠平衡感與運動功能的協調性。儀器設備上有一直徑約 3.1 公分可控制轉速之滾輪，機型為 ROTOROD Series 8, Model 755 (IITC Life Science)。首先利用 15 隻野生型 FVB 小鼠進行測試，建立野生型 FVB 小鼠之常模（圖五），最終所使用之

測試條件如下：先使小鼠平靜站立於靜止之滾輪上，滾輪於 300 秒 (5 分鐘) 之內由起始轉速 2 rpm 加速至 20 rpm、300 秒之後滾輪定速於 20 rpm，最長紀錄時間為 600 秒 (10 分鐘)，儀器可自動紀錄由滾輪起動至小鼠跌落滾輪所經歷之時間；實驗共進行四天，每隻小鼠每天進行三次測試，每次測試至少間隔一小時，使小鼠有充分之休息時間；前三天為訓練期，用以觀察小鼠學習之效果，第四天為測試期，做為小鼠 rota-rod 之行爲指標。將帶有不同轉殖基因之基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠分別進行 rota-rod 測試，並取第四天實驗數據進行數據分析。

(3) 抓力測試 (grip strengthen test)

小鼠之抓力以彈簧秤抓力計進行測量，先將小鼠置放於抓力計的拉桿前方，待其前肢自然握住拉桿後，抓取小鼠尾巴迅速向後拉，於小鼠前肢放開後紀錄捉力計上之數值。重複上述步驟三次後，求其平均抓力後進行分析。

十三、 免疫組織化學法 (Immunohistochemistry) 分析

小鼠先以腹腔注射的方式給予 avertin 進行麻醉。待麻醉後剪開

皮毛及肋骨，將腹部體壁橫向剪開，再向上沿腹中線剪開至胸骨停止，將橫隔膜剪破，沿兩側將肋骨剪斷後，把肋骨向上翻露出心臟，將裝有 0.9%生理食鹽水之針筒刺入左心室，利用小剪把右心房（呈深紅色）剪破，將 0.9%生理食鹽水緩緩注入進行灌流（如灌流成功，心臟、肝臟顏色會明顯變淡）。待血液完全用生理食鹽水置換後再灌入 4%的 paraformaldehyde 溶液以固定組織（如固定成功，四肢及尾巴會抖動，肝臟及身體會明顯變硬）。固定後取下腦部，先浸泡 4%的 paraformaldehyde 溶液進行後固定，隔日再將腦部組織移至 10%蔗糖溶液中靜置 1 小時，接著置換到 20%蔗糖溶液中靜置 2 小時，最後再移至 30%蔗糖溶液中兩天後切片。進行冷凍切片時，將腦組織由蔗糖溶液中移出，利用 OCT 將組織固定於冷凍切片機載台上，以 30 μm 的厚度切取小腦小葉矢狀切面 (sagittal) 的腦切片，將切片放置於玻片進行 Nissl stain，於顯微鏡下觀察 Purkinje cell 受損之情形，另一部份置於 24 孔盤中，準備進一步的染色處理。

切片首先以 PBS 清洗三次，再將切片置於 3%的 H_2O_2 30 分鐘，再以 PBS 清洗一次，之後置於山羊血清 (2% normal goat serum in PBS) 溶液室溫培養 2 小時，再加入 Blocking solution 並同時加入一級抗體 (稀釋倍率：抗 calbindin 單株抗體 1:1000，TBP (N-12) 1：1000，1C2

單株抗體 1：1000) 置於 4°C 培養。第二天，以 PBS 清洗三次，進行二級抗體培養加入 linking solution (6 滴/well)，以 PBS 清洗二次後加入 labeling solution (6 滴/well)。此時二級抗體的位置被接上 streptavidin 而 peroxidase 則被標定在 biotin 上，以其受質 diaminobenzidine (DAB) 與過氧化氫作用使其呈現棕色。染色後之切片再貼於載玻片上，水洗 1 分鐘，依序以不同濃度酒精溶液脫水 (50%、70%、95%、99.9%、99.9%各 3 分鐘)，再置入二甲苯中處理 1 分鐘使切片透明，最後用封片膠將蓋玻片蓋，並以顯微鏡進行觀察。

十四、統計方法 (Statistical analysis)

所有行為實驗結果數值以 Mean±S.E.M.表示，並以 student's t-test 進行統計分析，以 $p < 0.05$ 為認定具有統計上之顯著差異。

肆、研究結果

一、建立台灣不同族群 *SCA17 TBP* 基因 CAG 重複之遺傳資料庫

台灣族群 *TBP* 基因 CAG 重複序列基因型分析部分，目前已完成正常人族群部 440 條染色體分析，神經退化性疾病患者部分共完成 1410 條染色體分析，包括有 29 位運動失調患者、264 位帕金森氏症患者、274 位失智症患者以及 138 位其他類型之患者。如圖六所示，正常人族群與各種神經退化性疾病患者群間，*TBP* 基因 CAG 重複數目的分布情形並無明顯差異，所分析之各族群中 *TBP* 基因 CAG 重複數目皆以 36 個重複序列最為常見，但發現四位失智症患者 (45、46、46、46 個重複) 及二位 PD 患者 (46、46 個重複) 具不正常擴增的等位基因 (表四)，其中 F281、F297 分別為 F91 之子女，H889、H890 則為姊弟關係。各擴增之等位基因並經過定序分析，確定其 CAG/CAA 重複情形及總共重複次數 (表三)。

二、*SCA17 TBP* 基因轉殖小鼠之建立

以聚合酵素連鎖反應進行小鼠之基因型分析，目前得到 7 隻成功轉殖人類 *TBP* (*hTBP*) 基因之原源種基因轉殖小鼠 (Founder)，其中帶有 36 個 CAG 重複序列 *hTBP* 轉殖基因之小鼠有 1 隻，編號為 35，帶有 109 個 CAG 重複序列 *hTBP* 轉殖基因之小鼠計有 6 隻，編號分別為 16、20、43、54、69 與 71 (圖七)。由南方轉漬法分析結果發現，確實可於此 7 隻 Founder 小鼠基因組 DNA 中，利用人類 *TBP* 轉殖基因之專一性探針偵測到轉殖基因之訊號，並可發現各基因轉殖株所呈現之訊號強弱不一，經比較後可知道 *hTBP109Q* 的六隻基因轉殖小鼠中，編號為 16、43、71 三隻小鼠之轉殖基因拷貝數 (copy number) 較其他株來得高，其中又以編號 43 與 71 兩隻小鼠之拷貝數最高 (圖七)。基因轉殖小鼠之飼養與繁殖部份，利用野生型小鼠進行繁殖的結果發現，此七隻 Founder 小鼠均具有生殖能力，且均可順利將轉殖基因遺傳至後代。目前共計得到 7 株 (mouse line) 基因轉殖小鼠株，分別以 Founder 之序列編號命名：帶有 36 個 CAG 重複序列之基因轉殖株以 *hTBP36Q* line-35 表示；帶有 109 個 CAG 重複序列之基因轉殖株共有 6 株，分別以 *hTBP109Q* line-16，-20，-43，-54，-69，-71 表示。

由 Southern blot 結果已知各轉殖株之拷貝數並不相同，爲了更清楚掌握轉殖入小鼠基因中之轉殖基因數量，我們以聚合酵素連鎖反應進行拷貝數定量（圖八），精確計算出各基因轉殖株的小鼠基因組 DNA 中所帶有之拷貝數，結果如下： line-35 帶有 1 個 copy，line-16 帶有 5 個 copy，line-20 帶有 1 個 copy，line-43 帶有 21 個 copy，line-54 帶有 11 個 copy，line-69 帶有 8 個 copy，line-71 帶有 18 個 copy（表四），各轉殖株拷貝數相對量與 Southern blot 之結果相符合。

目前繁殖出 F1 子代中帶有轉殖基因之小鼠比例在各轉殖株之間有所差異（表五），在 *hTBP36Q* 的 F1 子代中帶有轉殖基因小鼠的比例爲 53.8%，*hTBP109Q* 部份則以 line-71 的 74.5% 最高，line-16 爲 51.3%，line-43 爲 45.7%，line-20 爲 41.9%，其餘兩株比例均在 10% 以下。爲了提高得到基因轉殖小鼠之效率，我們使用 F1 基因轉殖小鼠繼續進行繁殖，至目前爲止，在繁殖效率較低的 line-54 與 line-69 部分，分別提高了繁殖基因轉殖鼠之比例至 48.7% 與 52.2%（表五）。

三、*hTBP* 基因在基因轉殖小鼠腦部之表現

(1) RNA 之表現

利用 RT-PCR 分析人類 *TBP* 轉殖基因在基因轉殖小鼠體內表現的情形，目前共分析了包括 *hTBP36Q* line-35，*hTBP109Q* line-16、line-20、line-43、line-71 等 5 株。由結果可發現，在 *hTBP36Q* 中，*hTBP* 轉殖基因在小腦與大腦均可觀察到 RNA 的表現，且小腦之表現量較大腦為高；在 *hTBP109Q* 部份，*hTBP* 轉殖基因在小腦與大腦也都有 RNA 表現，唯經由小鼠的內生性 β -actin ($m\beta$ -actin) 校正後發現，line-16、-43、-71 等三株轉殖株之轉殖基因於小腦中 RNA 表現量較大腦中 RNA 表現量為高，而 line-20 之結果則是轉殖基因之 RNA 在大腦中的表現量高於小腦中的表現量（圖九）。

(2) 蛋白質之表現

目前分別萃取小腦與大腦組織之總蛋白質，並分別以 TBP (N-12) 抗體與 actin (Chemicon) 單株抗體進行 Western blot 分析，TBP (N-12) 抗體可以同時偵測人類與小鼠之 TBP，因此可藉以比較轉殖基因表現之 *hTBP* 與小鼠的內生性 TBP (*mTBP*) 之表現程度。研究分析結果發現，*hTBP109Q* 部份，在 line-54 與 line-69 基因轉殖小鼠株之大腦與小腦組織均可以測得帶有 109Q *hTBP* 之訊號，其中又以 line-54 之訊號最強；然而，在其餘各轉殖株之轉殖基因表現量均不明顯。藉由比

較小鼠內生性 TBP 及 actin 結果可發現，轉殖 *hTBP* 之 protein 表現量在小腦略多於大腦（圖十）。

四、基因轉殖小鼠之行爲檢測

(1) clasping 行爲觀察

在一般行爲觀察中，發現 *hTBP109Q* line-16 以及 *hTBP109Q* line-54 基因轉殖小鼠出現異常 clasping 現象（圖十一），在 line-16 方面，小鼠 clasping 症狀開始於第 40 週（約 10 個月），而 line-54 之小鼠則在約 6 個月左右觀察到 clasping 的症狀出現。然而相同年紀之非基因轉殖 FVB 小鼠則未觀察到此一現象。此種異常行爲在 HD 基因轉殖小鼠身上也曾被報導過（Mangiarini et al., 1996）。

(2) Locomotor 測試

爲了探討進行行爲實驗小鼠之基本運動能力是否出現差異，進行 locomotor 測試，在 *hTBP109Q* line-69 部分，分析同一胎出生之基因轉殖小鼠（Transgenic mice, Tg）與非基因轉殖小鼠（Non-transgenic mice, NT）結果發現，六個月大之小鼠在總運動距離

(distance moved) 與站立頻率 (rearing) 兩部份均沒有出現差異 (圖十二)。

(3) Rota-rod 行為測試

Rota-rod 主要可用來分析小鼠之平衡感與運動協調能力。目前已分析之基因轉殖株共有 4 株，分別為 *hTBP36Q* line-35，*hTBP109Q* line-16、line-54 以及 line-69，我們分別以同一胎出生之基因轉殖小鼠 (Tg) 與非基因轉殖小鼠 (NT) 進行分析。

在 CAG 重複序列屬於正常範圍的 *hTBP36Q* line-35 部份，共計已完成 2 個月、9 個月與 10 個月大之小鼠分析 (NT: $n \geq 5$, Tg: $n \geq 9$)，由結果可知，比較 line-35 之基因轉殖小鼠與同一胎出生之非基因轉殖小鼠，維持站在滾輪上的時間沒有差異，換句話說其平衡與協調能力方面並無差異 (圖十三)。

在 CAG 重複序列達致病範圍的 *hTBP109Q* 部份，針對最早觀察到 clasp 外顯性狀之 line-16 進行分析 (NT: $n \geq 10$, Tg: $n \geq 10$)，共計完成 5、6、7、14、15、17 及 18 個月之分析，結果發現即使將分

析年紀延長至一歲半以上，line-16 之基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠其表現仍未達統計上之差異（圖十四）。

在蛋白質表現較強之 line-54 與 line-69 兩株，均進行 Rota-rod 行為測試，結果發現在 line-69 部分，從 2 個月大開始基因轉殖小鼠 (Tg, n=11) 與非基因轉殖小鼠 (NT, n=12) 之表現出現極為顯著之差異，在後續分析 3、4、5 個月大之小鼠也均呈現此一差距，且由結果可觀察到 line-69 基因轉殖小鼠之表現有隨年齡增加行為表現逐漸不理想之趨勢（圖十二）。而在 line-54 部分，使用了 19 隻小鼠 (NT: n=9, Tg: n=10) 進行測試，目前已完成 6 個月大之小鼠分析，在連續四天的測試當中，前兩天基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之間差異並不顯著，第三天及第四天則均達到顯著差異（圖十五）。

此外，本實驗亦針對每群實驗小鼠進行體重之測量，由結果可知，無論是 hTBP36Q 或 hTBP109Q 之基因轉殖小鼠，其體重隨年齡增加均呈現正常之生長趨勢，且比較同一胎的基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠，其體重之間亦未出現差異性（圖十二、十三、十四、十五）。

(4) Grip strengthen 測試

目前針對 *hTBP36Q* line-35 與 *hTBP109Q* line-16 之小鼠分別測試其抓力表現，在 line-35 部份共完成 4 個月與 6 個月大之小鼠測試，line-16 部分則完成三次測試，分別為 2、9 與 10 個月大之小鼠。初步結果發現，無論在 line-35 或 line-16，帶有轉殖基因的小鼠與非基因轉殖小鼠之抓力強度並沒有差異（圖十三、十四）。

五、基因轉殖小鼠之腦組織病理學分析

由顯微鏡觀察分析 *hTBP* 基因轉殖小鼠小腦之 Purkinje cell 受損情形，針對行為測試中平衡與運動協調能力明顯受損之 *hTBP109Q* line-69 與 line-54 進行分析，在 Nissl stain 中發現，15 個月大之基因轉殖小鼠小腦中，幾乎找不到 Purkinje cell 的存在，相較於同年齡之 FVB 小鼠與 *hTBP36Q* line-35 之基因轉殖小鼠，均可清楚觀察到 Purkinje cell layer，顯示 line-69 與 line-54 之基因轉殖小鼠其小腦 Purkinje cell 有明顯受損之現象（圖十六）。進一步觀察以小腦 Purkinje cell 專一性抗體 calbindin 進行免疫組織染色之切片中也發現，line-69 基因轉殖小鼠的小腦中所染到之 Purkinje cell 數量的確明顯少於 FVB 或 *hTBP36Q* line-35 基因轉殖小鼠小腦中所染到之 Purkinje cell（圖十七 a，b，c）。另外我們利用 TBP (N-12) 抗體進行組織免疫染色觀察小腦組織中 TBP 表現情形，結果發現，在

hTBP109Q line-69 基因轉殖小鼠小腦中所染到之 TBP 其分布情形與 FVB 以及 *hTBP36Q* line-35 基因轉殖小鼠的小腦結果類似，並未明顯觀察到轉殖基因所表現之 TBP（圖十七 d，e，f）。為確定 line-69 小鼠腦中是否有 poly-Q 擴增之 TBP 堆積，我們使用 poly-Q 擴增蛋白質之專一性抗體 1C2 進行免疫組織染色，在 FVB 小鼠與 *hTBP36Q* line-35 基因轉殖小鼠小腦當中，均未出現明顯之訊號，然而在 *hTBP109Q* line-69 基因轉殖小鼠小腦當中，亦未觀察到有蛋白質不正常聚集之情況（圖十七 g，h，i），與上述以 TBP (N-12) 抗體染色所得到之結果類似。

為了確定 Purkinje cell 開始受損之時間點，我們接著使用在平衡功能方面已出現障礙之 *hTBP109Q* line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠，即年紀約為 6 個月大之小鼠分別進行小腦組織切片的免疫染色分析，由結果中顯示，在 line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠小腦切片中，calbindin 抗體染色可觀察到 Purkinje cell 染色訊號較 FVB 小鼠的染色訊號為弱，另外在形態與數量，甚至於細胞排列位置上，亦出現明顯異常，顯示此時 Purkinje cell 已明顯受損（圖十八 a，b，c）。另一方面我們以 TBP (N-12) 抗體進行染色的結果，在 line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠小腦切片中，可發現在 Purkinje cell 所該存在之位置有較強的訊號出現，且這些被染出深色的細胞主要為體積較大的細胞，然

而這樣的染色訊號在 FVB 小鼠的小腦組織切片中並不會觀察到（圖十八 d，e，f）。

爲了探討 Purkinje cell 受損的進程，我們進一步取 3 個月大 FVB 小鼠與 line-69 基因轉殖小鼠進行組織切片與免疫染色分析，由 calbindin 抗體染色結果中可以發現，Purkinje cell 的形態與數量均已出現異常（圖十九 a，d），在 TBP (N-12)抗體染色結果中也觀察到許多較大的細胞中染到較強烈的訊號，比較之前 6 個月大基因轉殖小鼠之染色結果，可大略發現此時間點染出深色訊號的細胞數量稍多（圖十九 b，e）。以 1C2 單株抗體進行染色觀察，結果未出現有蛋白質不正常聚集之情形發生，但 line-69 基因轉殖小鼠之切片呈色訊號較 FVB 小鼠切片中爲強（圖十九 c，f），與前述 15 個月大之小鼠切片染色結果類似。

伍、討論

一、*TBP* 基因 CAG 重複序列在台灣人族群中之分布情形

由結果（圖六）中可知，在台灣人族群中，*TBP* 基因以帶有 36 個 CAG 三核苷酸重複序列次數之比例最高（佔 50%以上），與 Reid 等人在白種人族群中所觀察到的最常見的 38 個重複次數 (Reid et al., 2003) 及 Rubinsztein 等人在南非黑人族群中所觀察到的最常見的 35 個重複次數 (Rubinsztein et al., 1996; Reid et al., 2003) 相異。由於多型性變異普遍存在於不同人種族群中，故推論其應在人種分化前即已演化出，此不同人種族群間的 CAG 三核苷酸重複次數分佈差異，則可能和創始者效應 (Founder effect) 有關。

在神經退化性病患的基因型檢測中，我們共發現四位失智症患者帶有異常擴增之等位基因。先前 De Michele 等人的研究報導了 SCA17 病患在臨床上出現失智的病徵 (De Michele et al., 2003)，且 Reid 等人的研究亦報導在阿茲罕默氏症患者的腦組織中發現不溶性的 *TBP* 異常聚積的情形 (Reid et al., 2004)，顯示 *TBP* 之功能異常可能與記憶功能的損壞或失智症之形成相關。本研究於 274 位失智症患者中發現四位具擴增之等位基因（表三），其中兩位 (F67、F91) 的臨床分析已

發表 (Wu et al., 2005)，另兩位 (F281、F297) 為 F91 之子女，因此 TBP 上的 poly-Q 片段不正常擴增可能與此家族的失智症相關。故推論可能有少部分阿茲罕默氏症之成因與 poly-Q 擴增之 TBP 相關。此家族中擴增之等位基因經過定序分析後，CAG/CAA 重複情形及總共重複次數皆相同，並未發生如 Maltecca 等人於一 SCA17 義大利家族中所觀察到的世代間的不穩定性 (intergenerational instability) 及 anticipation 現象 (Maltecca et al., 2003)。

另外在 264 位帕金森氏症患者的基因型檢測中，我們亦發現二位患者 (H889、H890) 具不正常擴增的等位基因 (46、46 個重複)，此二位 PD 患者為姊弟關係，兩人的擴增的等位基因皆遺傳自患有帕金森氏症的母親 (Wu et al., 2005; patient 1)。由於 SCA2、SCA12 亦會出現非小腦症狀如 dopamine-responsive 帕金森氏症候群及早發性震顫等 (Gwinn-Hardy et al., 2000; O'Hearn et al., 2001)，此 46 個重複的 TBP 等位基因亦可能和此家族的帕金森氏症性狀相關。由於神經退化性疾病之臨床病徵通常會有諸多類似，且其成因複雜，因此若能將分子檢測與臨床診斷結合，對於各種神經退化性疾病之判讀與治療之進行將會有更良好的效果。

二、建立帶有人類 *TBP* 基因之基因轉殖小鼠

爲了在小鼠小腦區域專一性大量表現人類 TBP，我們採用 FVB 品系小鼠，以原核胚顯微注射技術建立帶有人類不同 CAG 重複次數 *TBP* 基因之基因轉殖小鼠，並以 *pcp2/L7* 組織專一性啓動子控制 *TBP* 基因之表現。目前共獲得七隻帶有上述轉殖基因之小鼠，其中六隻帶有含 109 個 CAG 重複序列之 *TBP* 基因，一隻帶有含 36 個 CAG 重複序列之 *TBP* 基因。這七隻基因轉殖小鼠在外觀上並未出現明顯異常，且在繁殖過程中均可成功在第一子代中檢測出帶有轉殖基因之小鼠，代表這些小鼠均具有生殖能力，且其基因體 DNA 中所帶之轉殖基因均可穩定遺傳給下一代小鼠，如此方能飼養足夠之基因轉殖小鼠供實驗使用，因此目前共有七株基因轉殖小鼠可供後續之研究分析。然而由子代中得到轉殖基因小鼠之比例中可以發現，大多數基因轉殖小鼠的轉殖基因遺傳比例符合遺傳學定律，即基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之比例約在 50% 左右。然而在 *hTBP109Q* line-54 與 line-69 所產生之 F1 子代中基因轉殖小鼠所佔比例偏低，經由 F1 子代繼續繁殖，結果發現基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之比例可達到 50% 左右，因此推測在 line-54 與 line-69 之 founder 小鼠可能爲鑲嵌體 (mosaic)，以至於之前繁殖比例不如預期。

在轉殖基因套數分析方面，可以發現到藉由原核胚顯微注射技術所產製之基因轉殖小鼠，的確可以將轉殖基因大量插入小鼠基因體 DNA 之中，但所插入基因之拷貝數範圍則不易掌控，由本篇論文結果中可知最多可同時帶有 21 套轉殖基因，最少則僅帶有 1 套轉殖基因。

三、人類 *TBP* 基因在基因轉殖小鼠腦中表現情況

本篇論文將人類 *TBP* 基因構築於 *pcp2/L7* 啟動子之後，目的在使轉殖基因專一性大量表現於小鼠的小腦區域，根據前人研究指出，*pcp2/L7* 啟動子為 Purkinje cell protein 2 的原始啟動子，在小腦組織中的 Purkinje cell 有專一性的表現 (Nordquist et al., 1988)，在本篇論文中，藉由 RT-PCR 的結果中可發現，人類 *TBP* 轉殖基因在七株轉殖小鼠小腦組織當中均可測得其 RNA 表現，但是除了小腦中有表現之外，在大腦組織當中也同樣可以偵測到轉殖基因之 RNA 表現，顯示 *pcp2/L7* 啟動子在大腦與小腦當中均會表現。我們以小鼠內生性 *actin* 為標準，比較轉殖 *hTBP* 基因 RNA 在大腦與小腦組織中的表現程度，大部分為小腦中表現量高於大腦，僅有兩株其 RNA 表現量在大腦高於小腦，比較各株之轉殖基因拷貝數與 RNA 表現情形，可推論基因轉殖小鼠所帶有之轉殖基因拷貝數高低與其 RNA 在大腦與小腦中表

現比例無關，因此轉殖基因 RNA 在腦組織中的表現情形需要再做進一步研究，然而在本研究當中，對於疾病模式之建立主要以表現帶有 poly-Q 擴增之 TBP 為目的，然而 RNA 表現量並無法代表蛋白質的表現，我們進一步以西方墨漬法分析，利用 TBP 專一性抗體進行偵測，發現僅可以在 hTBP109Q line-54 與 line-69 兩株基因轉殖小鼠腦中明顯偵測到轉殖 TBP 表現之訊號，且無論在大腦或小腦組織均可偵測到轉殖 TBP 之表現，其餘各株或許因為表現量過低，並無法偵測到其訊號，由此也可證明轉殖基因之拷貝數多寡與其蛋白質表現程度並無絕對關係。綜合以上結果，本研究結果共得到兩株 (line-54, line-69) 成功於小腦中表現 poly-Q 擴增 TBP 之基因轉殖小鼠。

四、人類 TBP 基因轉殖小鼠行為上之異常現象

為了解 hTBP 基因轉殖小鼠是否出現類似 SCA17 病患臨床上之運動失調症狀，我們進行一系列行為分析，在外顯性狀上，我們發現到有兩株基因轉殖小鼠出現 clasping 之症狀，此種症狀已被報告在同為 poly-Q 擴增疾病的杭丁頓氏舞蹈症疾病模式小鼠中也可以觀察到，且為該基因轉殖小鼠身上穩定出現的症狀 (Mangiarini et al., 1996)，目前對於此種行為異常之成因仍不清楚，推測應與小鼠之神經細胞受損有關，然而確切的成因需再進一步分析小鼠腦中受損區域

與四肢運動之關連性，因此我們也將繼續觀察此一特殊症狀，以決定是否將其作為 SCA17 疾病模式小鼠的一種指標性症狀。

臨床上小腦萎縮症病人會出現步態失調等症狀，本篇研究使用旋轉滾輪 (rota-rod) 測試基因轉殖小鼠之平衡感與協調性運動功能，由目前已分析 4 株基因轉殖小鼠之結果中發現，hTBP109Q line-54 與 line-69 基因轉殖小鼠均可觀察到其行為表現明顯劣於非基因轉殖小鼠，顯示這兩株基因轉殖小鼠會出現與臨床病人相類似之症狀。另外我們也以 locomotor 分析 line-69 基因轉殖小鼠的基礎運動活性與探索行為，結果發現在 rota-rod 測試中出現顯著性差異的 line-69 部分，基因轉殖小鼠的自發性運動行為能力與非基因轉殖小鼠相比並無差異，意即在 rota-rod 當中所觀察到行為之差異並非小鼠的活動力較差，應是導因於基因轉殖小鼠的平衡感與協調功能受損。藉由此種實驗分析方式，可以提供我們相當重要的研究工具，一方面可藉由此種症狀的成因進行探討，以了解 SCA17 的致病機轉，另一方面可以提供藥物篩檢的平台，藉由 rota-rod 的分析檢測不同藥物對於行為能力的改善成效，作為評估藥物療效的依據。此外，在 line-54 與 line-69 之基因轉殖小鼠其運動失調症狀出現的時間點不同，推測可能與其小腦受損程度不同有關，可針對此兩株基因轉殖小鼠的發病時間做更精

準的測量，由於 SCA17 屬於晚發型神經退化性疾病，因此若有不同發病時程的基因轉殖小鼠株，可分別探討在不同年齡小鼠的小腦當中受 poly-Q 擴增 TBP 的影響是否有所差異，若無差異則可選擇較早發病之基因轉殖株作為相關研究材料，縮短研究所需時間。

另外在 hTBP109Q line-16 基因轉殖小鼠株部份，雖然外顯症狀上出現有 clasping 的現象，但是在 rota-rod 測試結果中基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之間並未出現明顯差異，顯示 clasping 的行為與平衡或運動協調功能之間並無絕對相關性，然而目前對於其他神經退化性疾病小鼠模式中所出現之 clasping 現象成因亦尚未有明確的解釋，因此若要釐清 clasping 的成因，可針對 line-16 基因轉殖小鼠其他腦區受損情況做深入探討，進一步研究 clasping 之行為與神經退化性疾病之間的關連性。

五、人類 TBP 基因轉殖小鼠腦部受損情況

為了探討在小鼠小腦 Purkinje cell 中大量表現 poly-Q 擴增 TBP 對組織所造成之影響，我們以免疫組織化學法分析小腦組織的受損情況，令人驚訝的是，在行為能力嚴重受損的 hTBP109Q line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠小腦切片中，幾乎找不到有 Purkinje cell 的存

在，進一步以 Purkinje cell 專一性抗體 calbindin 染色後也發現，Purkinje cell 之數量的確有明顯減少的情況，此種現象在 FVB 小鼠與 hTBP36Q line-35 基因轉殖小鼠小腦中均未出現，顯見 line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠在行為上出現之症狀與小腦當中的 Purkinje cell 數量嚴重減少有關。

在許多其他 poly-Q 擴增的神經退化性疾病當中，常會觀察到有蛋白質聚積所形成的包含體 (inclusion) 產生，因此我們也嘗試使用辨識 poly-Q 擴增蛋白質聚積的單株抗體 1C2 進行免疫染色，和預期一樣，在 FVB 小鼠與 hTBP36Q line-35 基因轉殖小鼠小腦中均無法染出明顯的訊號，但是在成功表現 hTBP109Q 的 line-69 基因轉殖小鼠中，我們分別觀察了 15 個月大與 3 個月大之基因轉殖小鼠，卻意外的均沒有觀察到 poly-Q 擴增蛋白質聚集所形成的包含體的出現，探討其原因，由於 line-69 基因轉殖小鼠的平衡感與協調性出現問題的年齡從 2 個月開始，且其運動失調的症狀由 2 到 5 個月即呈現明顯惡化的趨勢，而由 3 個月大的基因轉殖小鼠切片中也觀察到 Purkinje cell 在數量型態與分布位置均已出現異常，顯示小腦組織在 2 個月時已開始受到損害，然而 Purkinje cell 受損的速度比 Poly-Q 擴增蛋白質聚集成包含體的速度還快，或許無法在此時觀察到有包含體的出現，因此

由本研究結果可知在 3 個月大 line-69 基因轉殖小鼠小腦當中並無由 poly-Q 擴增蛋白質聚集成成的包涵體出現，並可推論在本研究中基因轉殖小鼠小腦中 Purkinje cell 的損傷並不需要伴隨著 Poly-Q 擴增蛋白質異常聚集的現象出現。

另外，目前對於 poly-Q 擴增蛋白質形成的包含體仍有許多不同觀點，許多研究認為包含體有細胞毒性，會導致神經細胞死亡並使病情惡化 (Davies et al., 1997)，另外也有研究認為包含體的產生可能是細胞當中一種對抗異常蛋白質產生的保護機制，即使抑制包含體的形成亦無法阻止神經細胞的死亡 (Saudou et al., 1998; Kim et al., 1999; Arrasate et al., 2004; Slow et al., 2005)。然而在本篇研究中，Purkinje cell 從受損到死亡的過程中均未觀察到有包含體的出現，因此若包含體可能不是疾病成因的一部分，本篇研究的結果即可證實包含體的出現並非神經退化性疾病產生的必要特徵。

陸、結論

本篇論文首先以台灣正常人族群與不同神經退化性疾病患者為分群依據，進行 *TBP* 基因之基因型分析，目前所建立完成之國人 *TBP* 基因上 CAG 三核苷酸重複序列之族群遺傳資料庫，對於相關研究將會有所幫助；另一方面藉由 *TBP* 基因型分析檢測出六位帶有 CAG 異常擴增 *TBP* 基因之神經退化性疾病患者，其中包含有失智症患者與帕金森氏症患者，也顯示出分子生物檢測對於神經退化性疾病臨床分析之貢獻。

為了建立 SCA17 疾病動物模式，本篇研究使用原核胚顯微注射技術產製帶有人類 SCA17 致病基因 *TBP* 之基因轉殖小鼠，目前成功建立帶有 109 個 CAG 三核苷酸重複序列 *TBP* 之基因轉殖小鼠，並完成包括轉殖基因表現程度、建立平衡感與協調性運動功能檢測模式、分析基因轉殖小鼠各種相關行為模式之表現，以及病理組織切片之分析，藉由以上的分析結果，我們所建立之 h*TBP* 基因轉殖小鼠可以作為 SCA17 疾病研究之模式動物，對於後續 SCA17 相關研究將有極大的幫助，關於致病機轉的研究方面，可以增加我們對於這些 poly-Q 擴增疾病的瞭解，更重要的是可做為臨床藥物篩檢的研究材料，藉由

藥物的開發將為 SCA17 的小腦萎縮症患者帶來福音，創造更美好的生活品質。

柒、參考文獻

- Aguiar J, Fernandez J, Aguilar A, Mendoza Y, Vazquez M, Suarez J, Berlanga J, Cruz S, Guillen G, Herrera L, Velazquez L, Santos N, Merino N (2006) Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice. *Neurosci Lett* 392:202-206.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Baader SL, Schilling K (1996) Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16:1440-1449.
- Bauer P, Laccone F, Rolfs A, Wullner U, Bosch S, Peters H, Liebscher S, Scheible M, Epplen JT, Weber BH, Holinski-Feder E, Weirich-Schwaiger H, Morris-Rosendahl DJ, Andrich J, Riess O (2004) Trinucleotide repeat expansion in SCA17/TBP in white patients with Huntington's disease-like phenotype. *J Med Genet* 41:230-232.
- Brusco A, Gellera C, Cagnoli C, Saluto A, Castucci A, Michielotto C, Fetoni V, Mariotti C, Migone N, Di Donato S, Taroni F (2004) Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol*

61:727-733.

- Burright EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* 82:937-948.
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Grisoli M, Di Bella D, Migone N, Gellera C, Di Donato S, Brusco A (2006) SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* 129:235-242.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- De Michele G, Maltecca F, Carella M, Volpe G, Orio M, De Falco A, Gombia S, Servadio A, Casari G, Filla A, Bruni A (2003) Dementia, ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy: phenotype spectrum in two Italian families with spinocerebellar ataxia type 17. *Neurol Sci* 24:166-167.
- Dunn ME, Schilling K, Mugnaini E (1998) Development and fine structure of murine Purkinje cells in dissociated cerebellar cultures: dendritic differentiation, synaptic maturation, and formation of cell-class specific features. *Anat Embryol (Berl)* 197:31-50.
- Fujigasaki H, Martin JJ, De Deyn PP, Camuzat A, Deffond D, Stevanin G, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Durr A, Brice A (2001) CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes

- autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124:1939-1947.
- Gostout B, Liu Q, Sommer SS (1993) "Cryptic" repeating triplets of purines and pyrimidines (cRRY(i)) are frequent and polymorphic: analysis of coding cRRY(i) in the proopiomelanocortin (POMC) and TATA-binding protein (TBP) genes. *Am J Hum Genet* 52:1182-1190.
- Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, Liu TY, Boss M, Seltzer W, Adam A, Singleton A, Koroshetz W, Waters C, Hardy J, Farrer M (2000) Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology* 55:800-805.
- Harding AE (1993) Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol* 61:1-14.
- Hernandez D, Hanson M, Singleton A, Gwinn-Hardy K, Freeman J, Ravina B, Doheny D, Gallardo M, Weiser R, Hardy J, Singleton A (2003) Mutation at the SCA17 locus is not a common cause of parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 9:317-320.
- Higgins GA, Jacobsen H (2003) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol* 14:419-438.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Viera-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23:391-392.
- Hsieh M, Lin SJ, Chen JF, Lin HM, Hsiao KM, Li SY, Li C, Tsai CJ

- (2000) Identification of the spinocerebellar ataxia type 7 mutation in Taiwan: application of PCR-based Southern blot. *J Neurol* 247:623-629.
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13:196-202.
- Imbert G, Trottier Y, Beckmann J, Mandel JL (1994) The gene for the TATA binding protein (TBP) that contains a highly polymorphic protein coding CAG repeat maps to 6q27. *Genomics* 21:667-668.
- Jaenisch R, Mintz B (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1250-1254.
- Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G (2003) Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cytogenet Genome Res* 100:243-251.
- Kim M, Lee HS, LaForet G, McIntyre C, Martin EJ, Chang P, Kim TW, Williams M, Reddy PH, Tagle D, Boyce FM, Won L, Heller A, Aronin N, DiFiglia M (1999) Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci* 19:964-973.
- Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8:2047-2053.
- Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW,

- Ranum LP (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21:379-384.
- Maltecca F, Filla A, Castaldo I, Coppola G, Fragassi NA, Carella M, Bruni A, Coccozza S, Casari G, Servadio A, De Michele G (2003) Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17. *Neurology* 61:1441-1443.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Maschke M, Oehlert G, Xie TD, Perlman S, Subramony SH, Kumar N, Ptacek LJ, Gomez CM (2005) Clinical feature profile of spinocerebellar ataxia type 1-8 predicts genetically defined subtypes. *Mov Disord* 20:1405-1412.
- McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9:2197-2202.
- Mohn AR, Feddersen RM, Nguyen MS, Koller BH (1997) Phenotypic analysis of mice lacking the highly abundant Purkinje cell- and bipolar neuron-specific PCP2 protein. *Mol Cell Neurosci* 9:63-76.
- Morfini G, Pigino G, Brady ST (2005) Polyglutamine expansion diseases: failing to deliver. *Trends Mol Med* 11:64-70.
- Nakamura K, Jeong SY, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001) SCA17, a novel autosomal

- dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10:1441-1448.
- Nordquist DT, Kozak CA, Orr HT (1988) cDNA cloning and characterization of three genes uniquely expressed in cerebellum by Purkinje neurons. *J Neurosci* 8:4780-4789.
- O'Hearn E, Holmes SE, Calvert PC, Ross CA, Margolis RL (2001) SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion. *Neurology* 56:299-303.
- Oberdick J, Levinthal F, Levinthal C (1988) A Purkinje cell differentiation marker shows a partial DNA sequence homology to the cellular sis/PDGF2 gene. *Neuron* 1:367-376.
- Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143:1457-1470.
- Reid SJ, van Roon-Mom WM, Wood PC, Rees MI, Owen MJ, Faull RL, Dragunow M, Snell RG (2004) TBP, a polyglutamine tract containing protein, accumulates in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 125:120-128.
- Reid SJ, Rees MI, van Roon-Mom WM, Jones AL, MacDonald ME, Sutherland G, During MJ, Faull RL, Owen MJ, Dragunow M, Snell RG (2003) Molecular investigation of TBP allele length: a SCA17 cellular model and population study. *Neurobiol Dis* 13:37-45.
- Rolfs A, Koeppen AH, Bauer I, Bauer P, Buhlmann S, Topka H, Schols L, Riess O (2003) Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17). *Ann Neurol* 54:367-375.
- Ross CA (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying

mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35:819-822.

Rubinsztein DC, Leggo J, Crow TJ, DeLisi LE, Walsh C, Jain S, Paykel ES (1996) Analysis of polyglutamine-coding repeats in the TATA-binding protein in different human populations and in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet* 67:495-498.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.

Schilling G, Wood JD, Duan K, Slunt HH, Gonzales V, Yamada M, Cooper JK, Margolis RL, Jenkins NA, Copeland NG, Takahashi H, Tsuji S, Price DL, Borchelt DR, Ross CA (1999) Nuclear accumulation of truncated atrophin-1 fragments in a transgenic mouse model of DRPLA. *Neuron* 24:275-286.

Schols L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3:291-304.

Silveira I, Miranda C, Guimaraes L, Moreira MC, Alonso I, Mendonca P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coelho J, Ferreira F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januario C, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J (2002) Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 59:623-629.

Slow EJ, Graham RK, Osmand AP, Devon RS, Lu G, Deng Y, Pearson J,

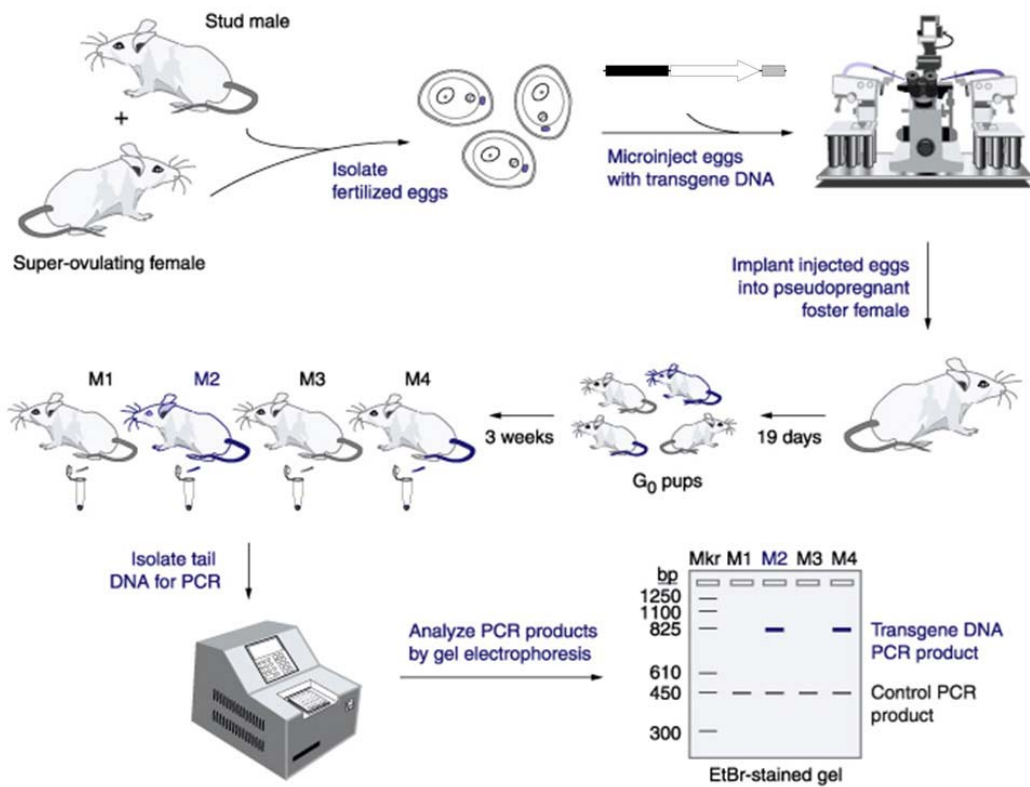
- Vaid K, Bissada N, Wetzel R, Leavitt BR, Hayden MR (2005) Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11402-11407.
- Soong BW, Lu YC, Choo KB, Lee HY (2001) Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Taiwanese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Arch Neurol* 58:1105-1109.
- Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre AS, Camuzat A, Jeannequin C, Dode C, Takahashi J, San C, Bellance R, Brice A, Durr A (2003) Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain* 126:1599-1603.
- Strong PN, Brewster BS (1997) Myotonic dystrophy: molecular and cellular consequences of expanded DNA repeats are elusive. *J Inherit Metab Dis* 20:159-170.
- Wanner I, Baader SL, Brich M, Oberdick J, Schilling K (1997) Subcellular localization of specific mRNAs and their protein products in Purkinje cells by combined fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol* 108:345-357.
- Waters MF, Fee D, Figueroa KP, Nolte D, Muller U, Advincula J, Coon H, Evidente VG, Pulst SM (2005) An autosomal dominant ataxia maps to 19q13: Allelic heterogeneity of SCA13 or novel locus? *Neurology* 65:1111-1113.
- Wu YR, Fung HC, Lee-Chen GJ, Gwinn-Hardy K, Ro LS, Chen ST, Hsieh-Li HM, Lin HY, Lin CY, Li SN, Chen CM (2005) Analysis

- of polyglutamine-coding repeats in the TATA-binding protein in different neurodegenerative diseases. *J Neural Transm* 112:539-546.
- Yamada M, Sato T, Shimohata T, Hayashi S, Igarashi S, Tsuji S, Takahashi H (2001) Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am J Pathol* 159:1785-1795.
- Yvert G, Lindenberg KS, Devys D, Helmlinger D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL (2001) SCA7 mouse models show selective stabilization of mutant ataxin-7 and similar cellular responses in different neuronal cell types. *Hum Mol Genet* 10:1679-1692.
- Zhang X, Baader SL, Bian F, Muller W, Oberdick J (2001) High level Purkinje cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic mice. *Histochem Cell Biol* 115:455-464.
- Zoghbi HY, Orr HT (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:217-247.
- Zuhlke C, Gehlken U, Hellenbroich Y, Schwinger E, Burk K (2003) Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene. Reduced penetrance in SCA17? *J Neurol* 250:161-163.
- Zuhlke C, Hellenbroich Y, Dalski A, Kononowa N, Hagenah J, Vieregge P, Riess O, Klein C, Schwinger E (2001) Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. *Eur J Hum Genet* 9:160-164.

捌、附錄圖表

附表一、SCA 基因

疾病	基因	蛋白質產物	重複單位：位置	擴增範圍
SCA1	<i>SCA1</i>	ataxin 1	CAG：5' exon	40-82
SCA2	<i>SCA2</i>	ataxin 2	CAG：5' exon	34-59
SCA3	<i>SCA3</i>	ataxin 3	CAG：3' exon	55-200
SCA6	<i>CACNA1A</i>	α_{1A} -Ca ²⁺ channel	CAG：3' exon	21-33
SCA7	<i>SCA7</i>	ataxin 7	CAG：5' exon	37>300
SCA8	<i>SCA8</i>		CTG：3' UTR	68-800
SCA10	<i>SCA10</i>	E46	ATTCT：intron 9	>1000
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	PPP2AB β	CAG：promoter	60-93
SCA17	<i>SCA17</i>	TBP	CAG：5' exon	43-78



附圖一、基因轉殖小鼠之建立：原胚核顯微注射法流程

表一、基因型分析 PCR 放大引子及條件

基因	引子對	鍊合溫度 (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)	長度(bp) (重複次數)
SCA17	F: Hex-ATGCCTTATGGCACTGGACTG R: CTGCTGGGACGTTGACTGCTG	58	1.0	0.2	186-237 (25-42)
Hex 表示引子所接的螢光種類					

表二、基因轉殖小鼠基因型分析 PCR 放大引子及條件

用途	引子對	鍊合溫度 (°C)	MgCl ₂ (mM)	長度(bp) (重複次數)
hTBP transgene	F: TATGGTGAGAGCAGAGATGG R: AGGCAAGGGTACATGAGAGCCAT	54	1.0	1.2K-1.3K (36-109)
Transgene copy no.	F: TATGGTGAGAGCAGAGATGG R: CTGCTGGGACGTTGACTGCTG	53	1.5	550-769
mβ-actin	F: ATGGATGACGATATCGCT R: ATGAGGTAGTCTGTCAGGT	53	1.5	550

表三、*TBP* 基因帶有三核苷酸序列異常擴增病患之定序結果

編號	年齡/性別	重複次數 (repeat no.)	重複序列 (Repeat sequence)	Diagnosis
F67	59/F	45	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₁₁ CAACAGCAA(CAG) ₂₃ CAACAG	Dementia
F91	76/F	46	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₉ CAACAG	Dementia
F281	52/M	46	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₉ CAACAG	Dementia
F297	50/F	46	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₉ CAACAG	Dementia
H889	49/F	46	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₉ CAACAG	PD
H890	42/M	46	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₉ CAACAG	PD
H1173	62/F	44		PD

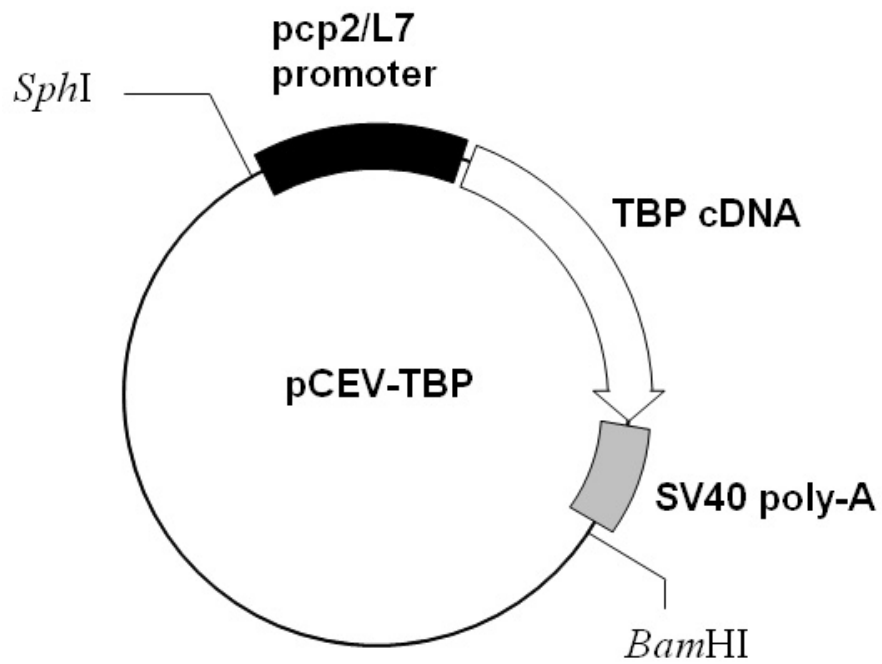
(PD , Parkinson's disease)

表四、*hTBP* 各基因轉殖小鼠株所帶有之轉殖基因套數

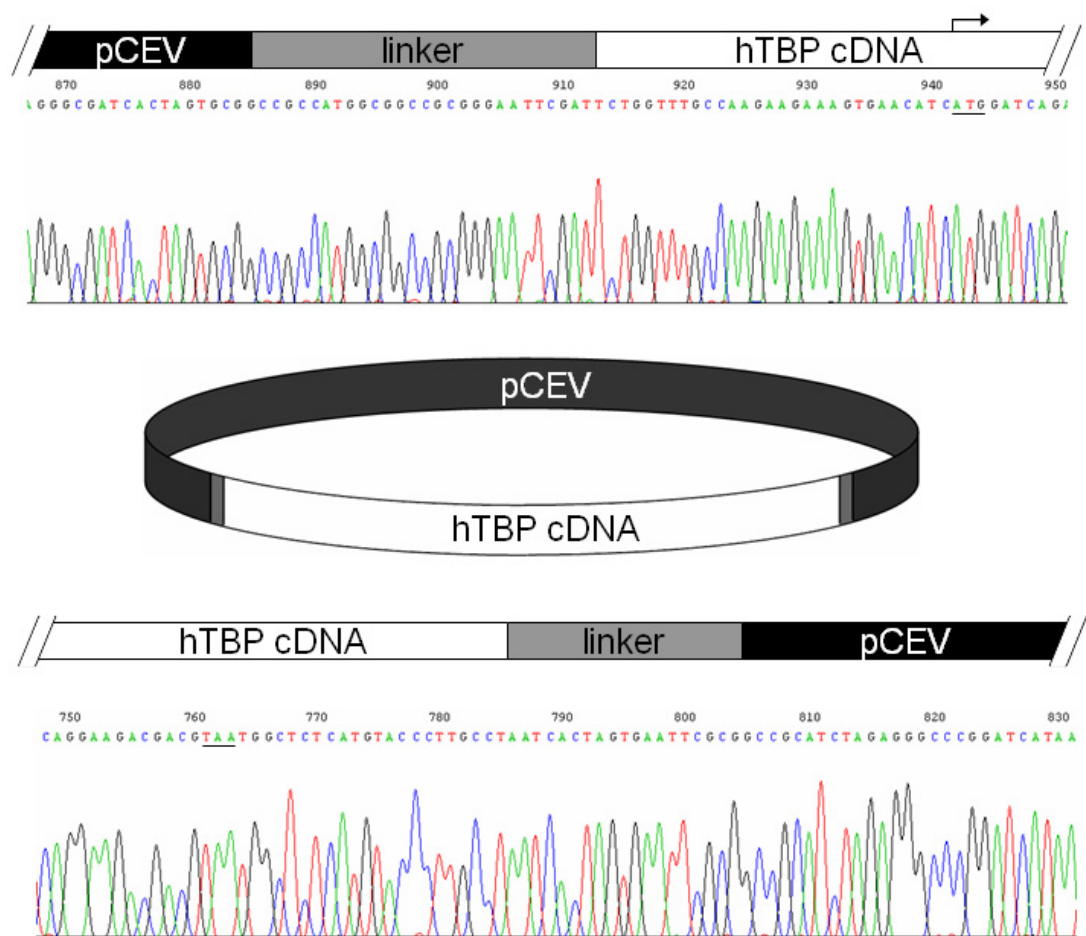
Transgenic line	<i>hTBP36Q</i>			<i>hTBP109Q</i>			
	line-35	line-16	line-20	line-43	line-54	line-69	line-71
Copy number	1	5	1	21	11	8	18

表五、hTBP 基因轉殖小鼠飼育數量統計表

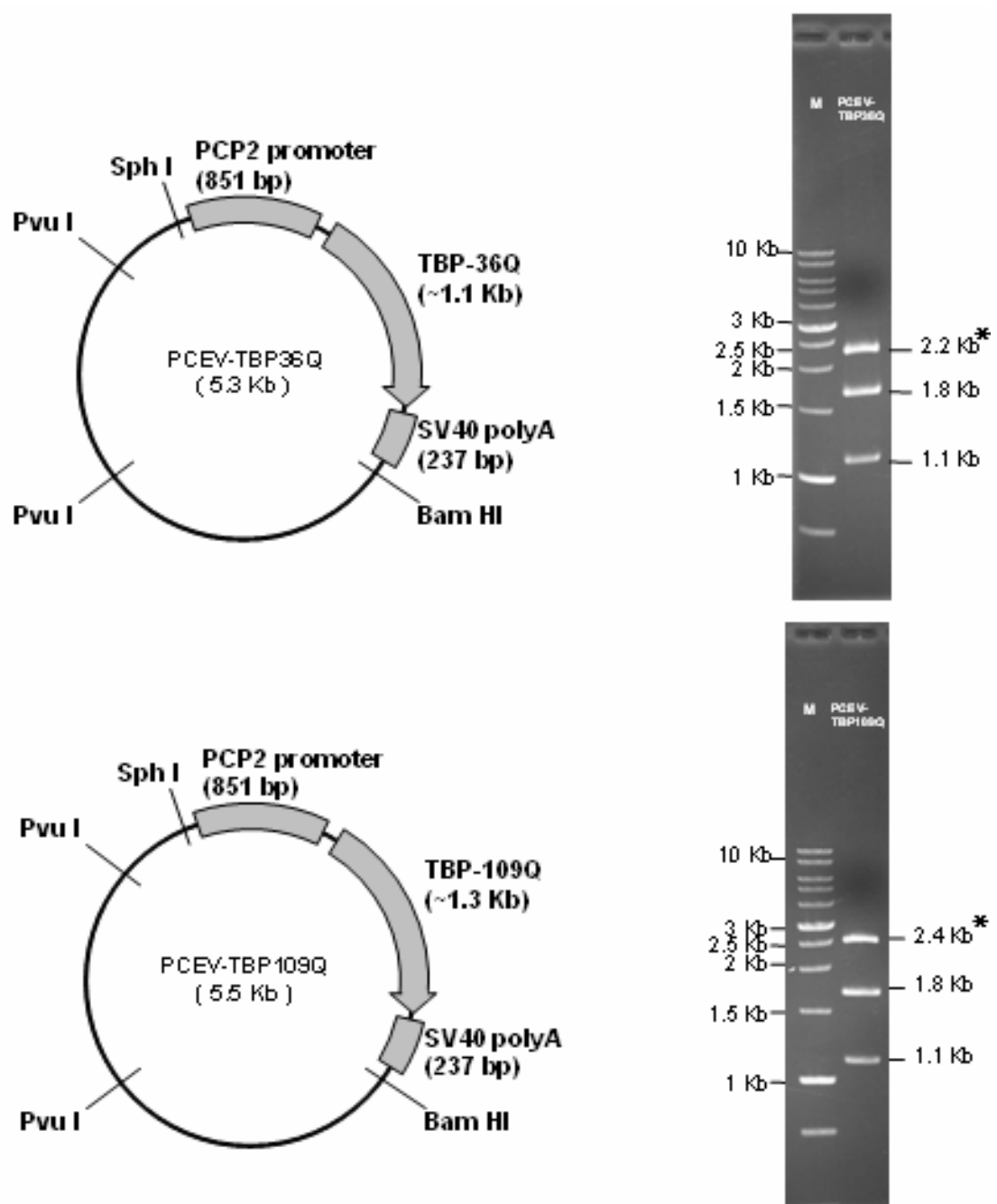
Transgenic line	F1 positive	F1 negative	Proportion (%)
hTBP36Q			
line-35	35	30	53.8
hTBP109Q			
line-16	20	19	51.3
line-20	18	25	41.9
line-43	21	25	45.7
line-54	3	31	8.8
line-69	4	39	10.0
line-71	38	13	74.5
Transgenic line	F2 positive	F2 negative	Proportion (%)
hTBP109Q			
line-54	19	20	48.7
line-69	12	11	52.2



圖一、hTBP 基因轉殖質體。轉殖基因包含 pc2/L7 組織專一性啓動子，人類 TBP 基因 cDNA 以及 SV40 poly-A 片段，並設計以 *SphI* 與 *BamHI* 限制酵素進行切割與純化。



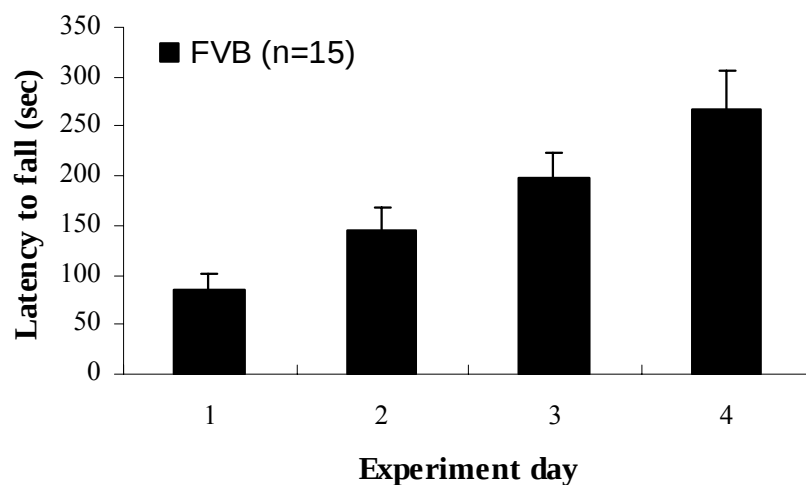
圖二、*hTBP* 基因轉殖質體之 DNA 片段定序圖。構築完成之基因轉殖質體經定序確認序列無誤，圖中僅表示進行接合反應之鄰近區域之定序圖。*hTBP* cDNA 原構築於 pGEM-T 質體上，linker 部分表示原本位於 pGEM-T 質體上經限制酵素切割後殘留之片段。



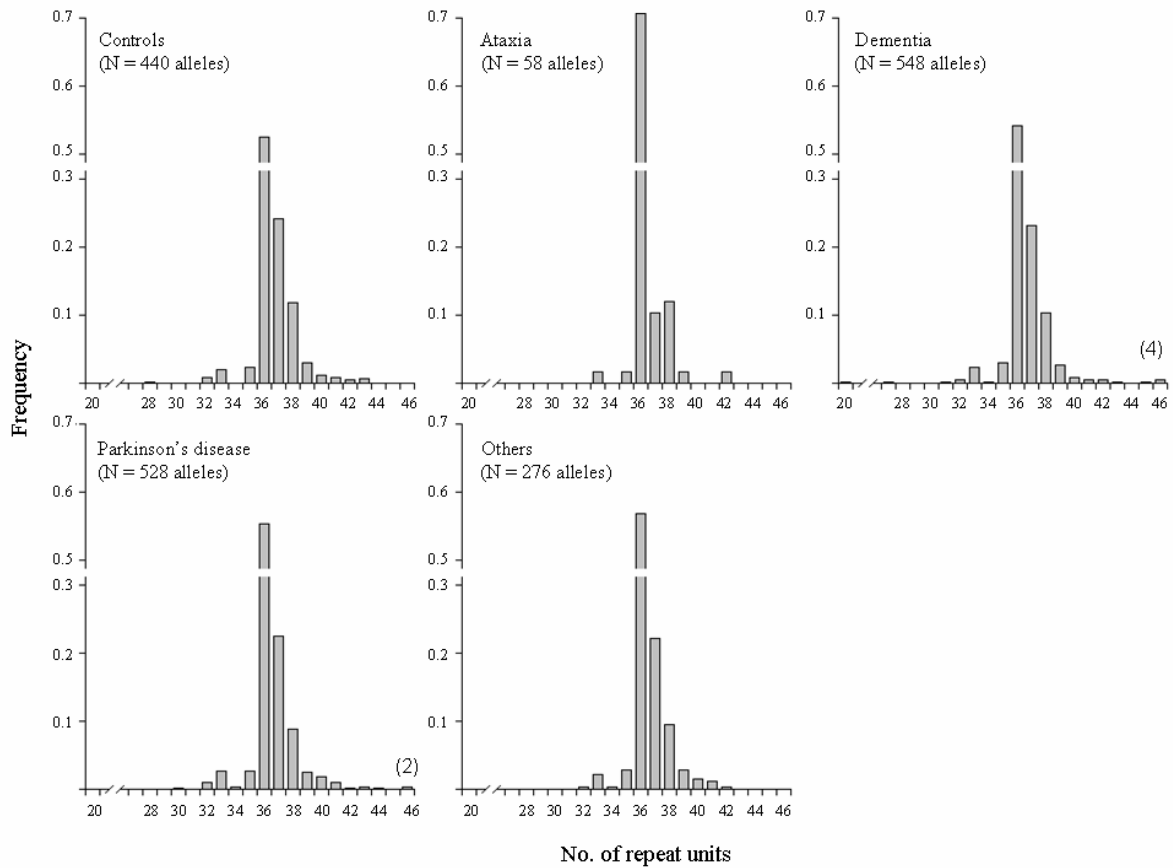
圖三、顯微注射片段酵素切割示意圖與電泳圖。上圖為 *hTBP36Q* 基因轉殖質體示意圖與限制酵素切割檢查電泳圖，下圖為 *hTBP109Q* 基因轉殖質體示意圖與限制酵素切割檢查電泳圖。*表示進行原核胚顯微注射所純化之片段。



圖四、南方墨漬法探針示意圖。所使用之探針為緊臨 *hTBP* cDNA 上 CAG 重複序列 (▨ 部分) 之 3'端，共 619 bp 之片段。

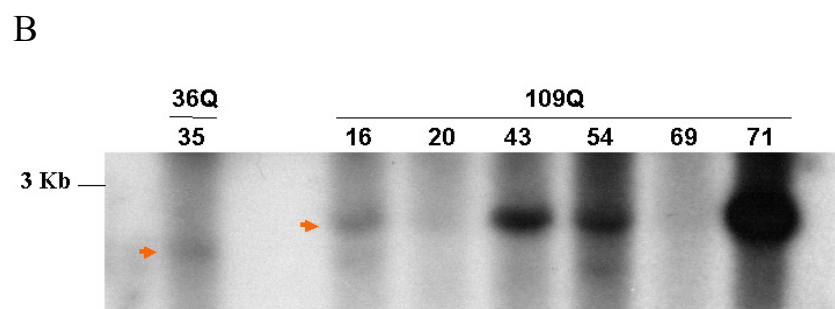
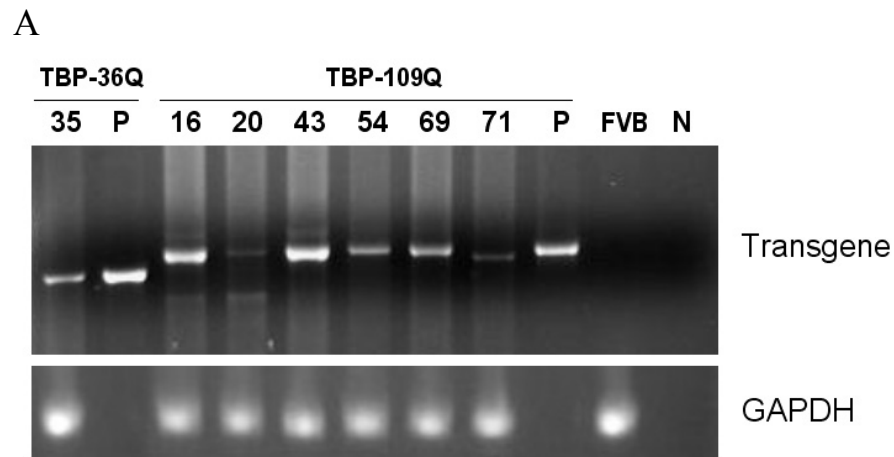


圖五、FVB 小鼠之 rota-rod 行為常模 (norm)。實驗共使用 15 隻 FVB 小鼠，連續進行四天測試，可觀察到 FVB 小鼠具有良好學習成效，以此作為 FVB 小鼠 rota-rod 之分析標準。實驗數據以 Mean $\pm$ SEM 表示。



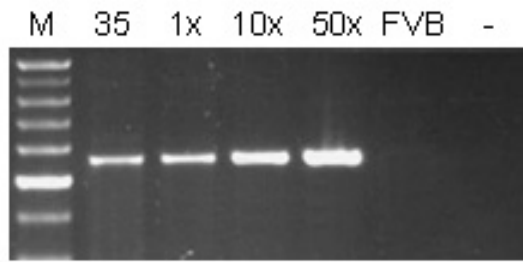
圖六、台灣不同族群 SCA17 *TBP* 基因 CAG 重複序列基因型分析圖。

圖中顯示正常人族群與各種神經退化性疾病患者群間，*TBP* 基因 CAG 重複數目的分布情形類似，所分析之各族群中 *TBP* 基因 CAG 重複數目皆以 36 個重複序列所佔比例最高。另外發現四位失智症患者 (45、46、46、46 個重複) 及二位 PD 患者 (46、46 個重複) 具不正常擴增的等位基因。

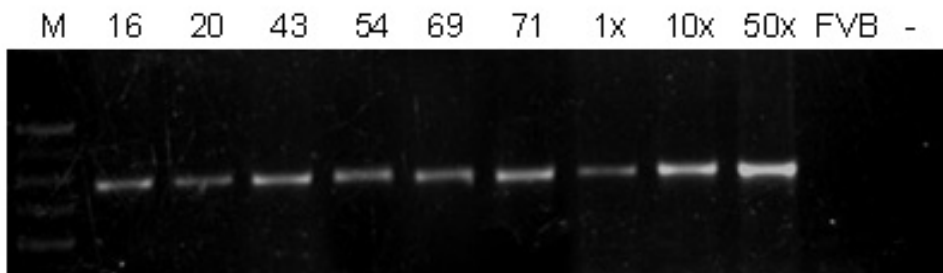


圖七、h*TBP* 基因轉殖小鼠基因型分析與南方墨漬法分析結果。A. PCR 分析基因轉殖 founder 小鼠之基因型，以基因轉殖質體為正控制組 (P)，同時以 FVB 小鼠基因體 DNA (FVB) 與不加任何 DNA 之負控制組 (N) 做對照，DNA 品質以 GAPDH 進行檢測。B. 以 619 bp 探針進行 Southern blot 分析，圖中箭頭所指位置顯示在七株基因轉殖小鼠基因體 DNA 中均可以偵測到有 h*TBP* 轉殖基因存在。

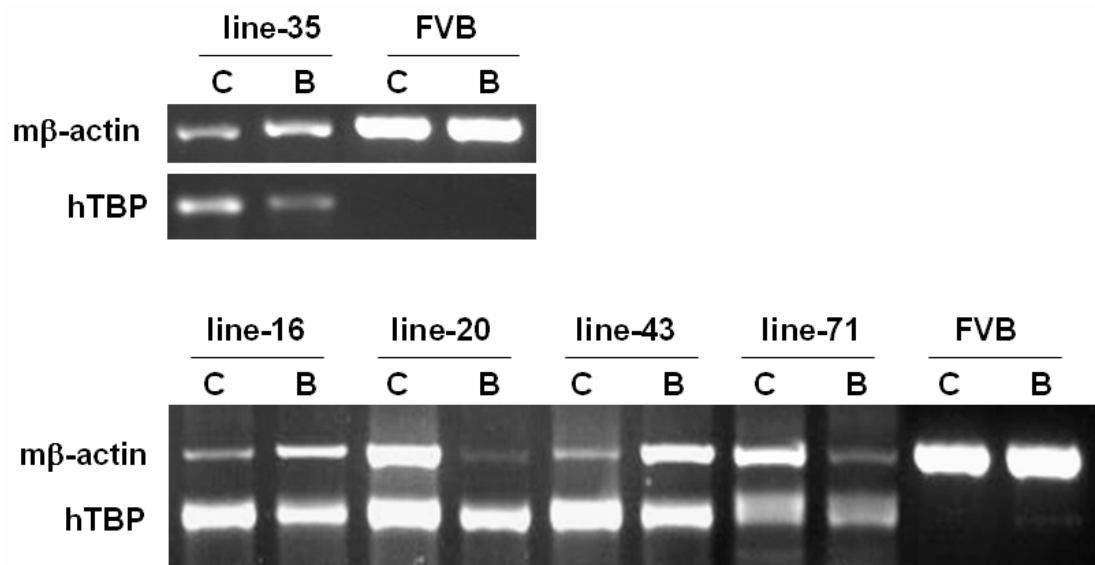
A



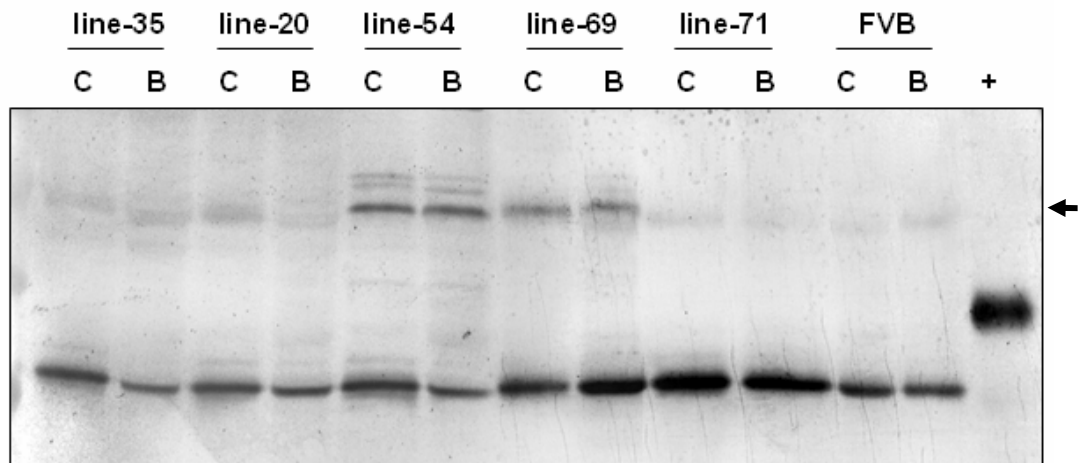
B



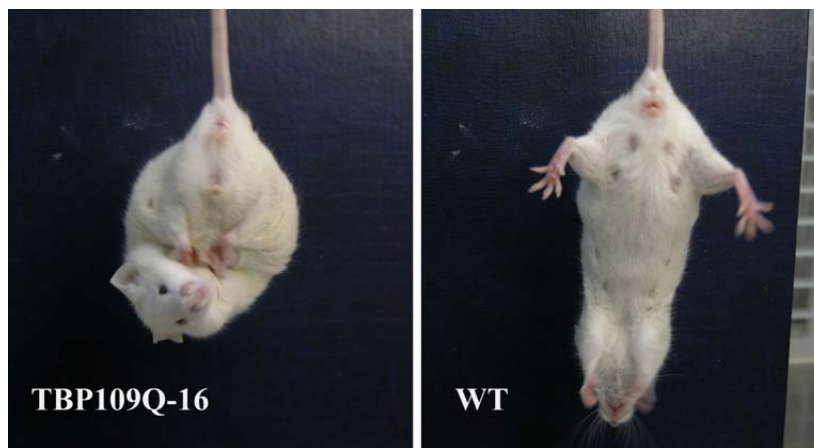
圖八、*hTBP* 基因轉殖小鼠轉殖基因拷貝數 (copy number) 定量之聚合酵素鏈反應 (PCR) 電泳圖。經過計算後分別以基因轉殖質體稀釋成 1、10、50 個拷貝數之濃度 (1×, 10×, 50×) 進行 PCR，並將各株基因轉殖小鼠之 PCR 產物比對標準曲線，換算各基因轉殖株所帶有的拷貝數。



圖九、*hTBP* 基因轉殖小鼠 RT-PCR 實驗結果。*hTBP* 轉殖基因 RNA 在各基因轉殖小鼠株之小腦與大腦組織中均會表現，並同時以小鼠 β -actin 比較其表現量，發現 *hTBP* 轉殖基因 RNA 在小腦與大腦中表現量並不相等（C: cerebellum; B: brain tissue）。

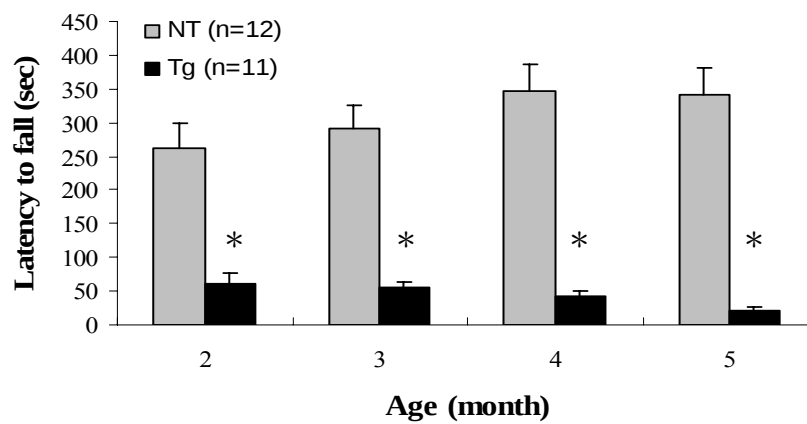


圖十、基因轉殖小鼠西方墨漬法分析結果。在 *hTBP*109Q line-54 與 line-69 可明顯觀察到帶有 109Q TBP 之訊號。以 SK-N-SH cell lysate 做為正控制組 (+)，其所表現之 TBP 上帶有 36Q。(C: cerebellum; B: brain tissue，箭頭表示帶有 109Q 之 TBP 位置)

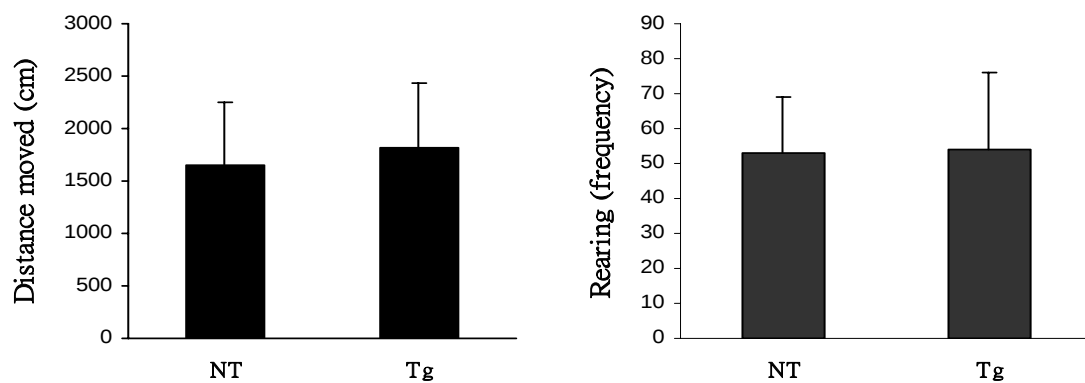


圖十一、*hTBP* 基因轉殖小鼠 clasping 行為照片。*hTBP*109Q line-16 基因轉殖小鼠症狀出現年齡約 10 個月大，*hTBP*109Q line-54 基因轉殖小鼠症狀出現年齡約 6 個月大。

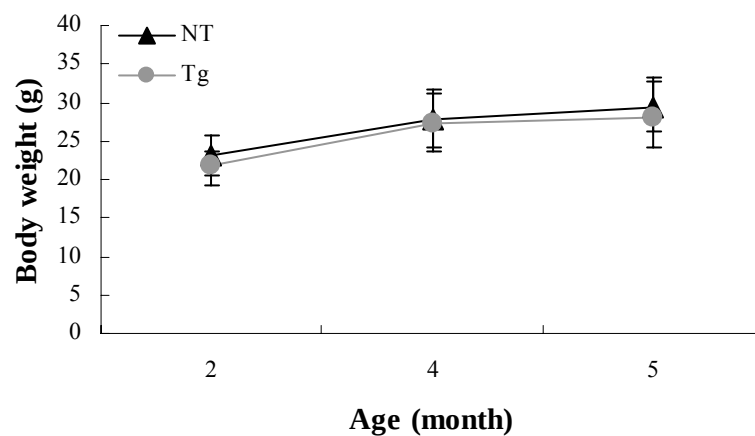
A.



B.

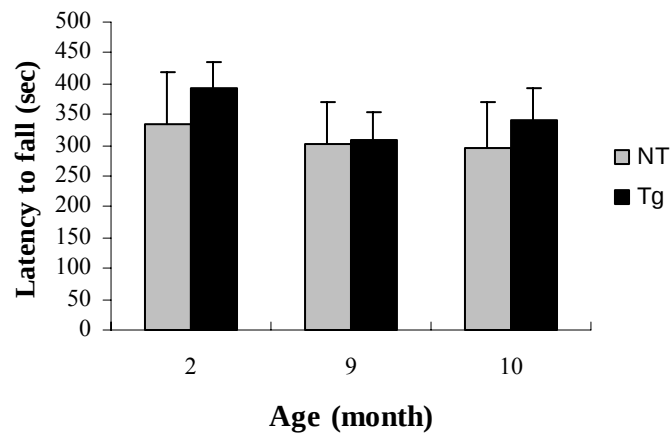


C.

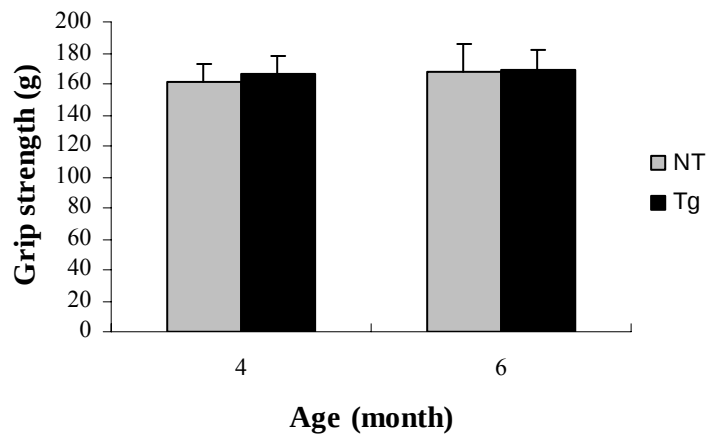


圖十二、hTBP109Q line-69 行為分析結果。A. 由 rota-rod 分析發現 line-69 基因轉殖小鼠平衡感與運動協調功能嚴重受損，且隨年齡增加（2 個月到 5 個月大）其表現與非基因轉殖小鼠之差異越大（* $p < 0.05$ ）。B. 由 locomotor 分析結果發現，line-69 基因轉殖小鼠與同一胎非基因轉殖小鼠之水平移動距離與垂直運動頻率均無差異，顯示基本運動活性並未受損。C. 分析小鼠不同年齡之體重，line-69 基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之間亦無差異。實驗數據以 Mean $\pm$ SEM 表示。

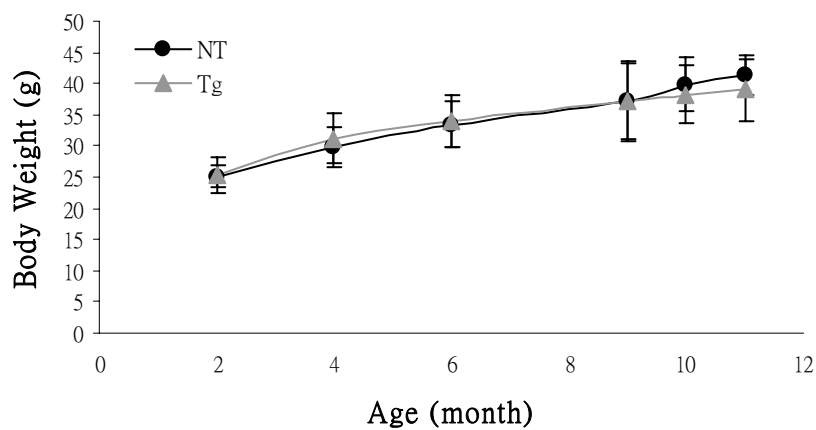
A.



B.

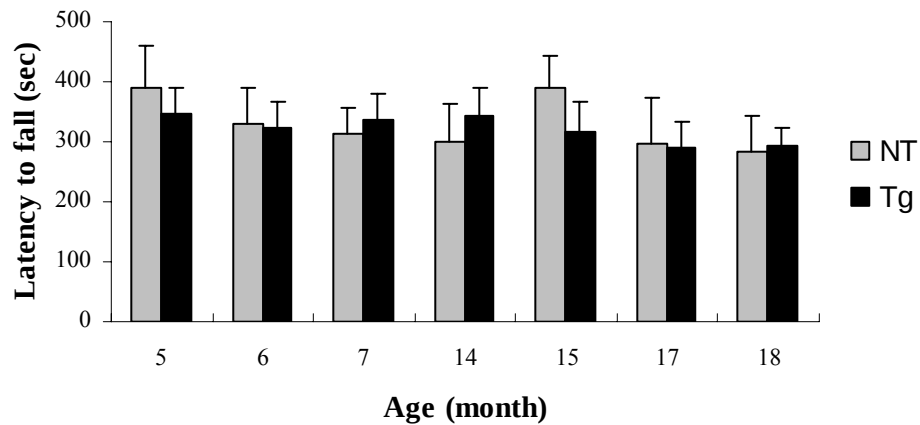


C.

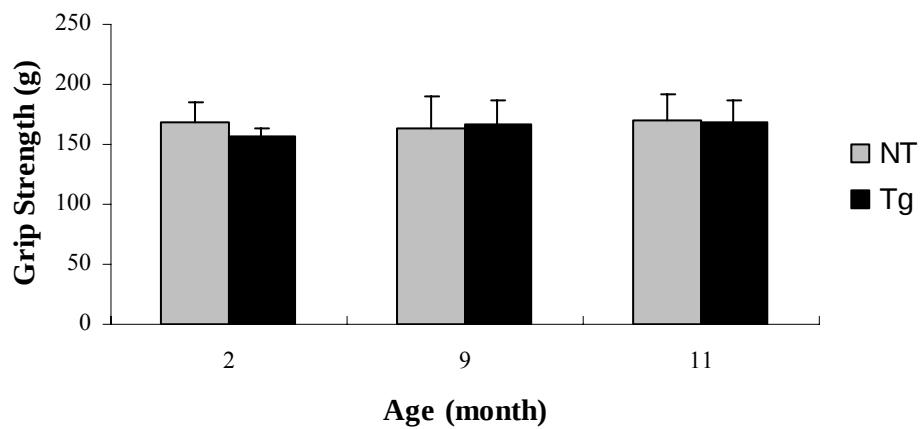


圖十三、hTBP36Q line-35 行為分析結果 (NT : $n \geq 5$, Tg : $n \geq 9$)。A. 由 rota-rod 分析結果發現，2 個月到 10 個月大之基因轉殖小鼠其表現與非基因轉殖小鼠之間均未達顯著差異。B. 分析小鼠拉力強度，發現 4 個月與 6 個月大之基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠拉力強度並無差異。C. 分析小鼠不同年齡之體重，line-35 基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之間亦無差異。實驗數據以 Mean $\pm$ SEM 表示。

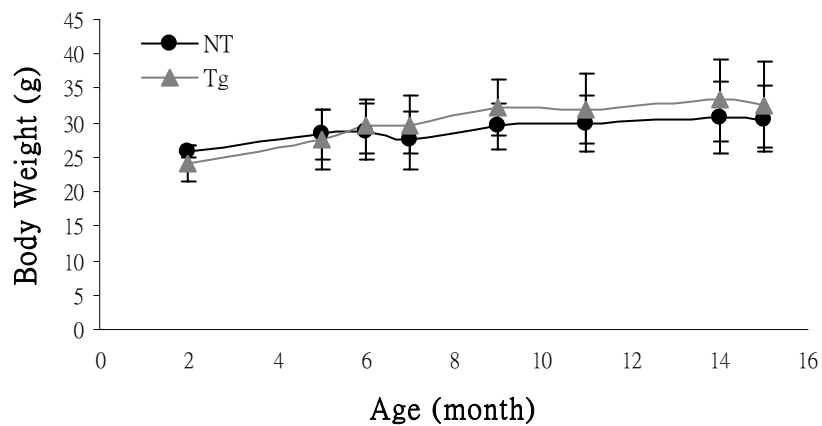
A.



B.

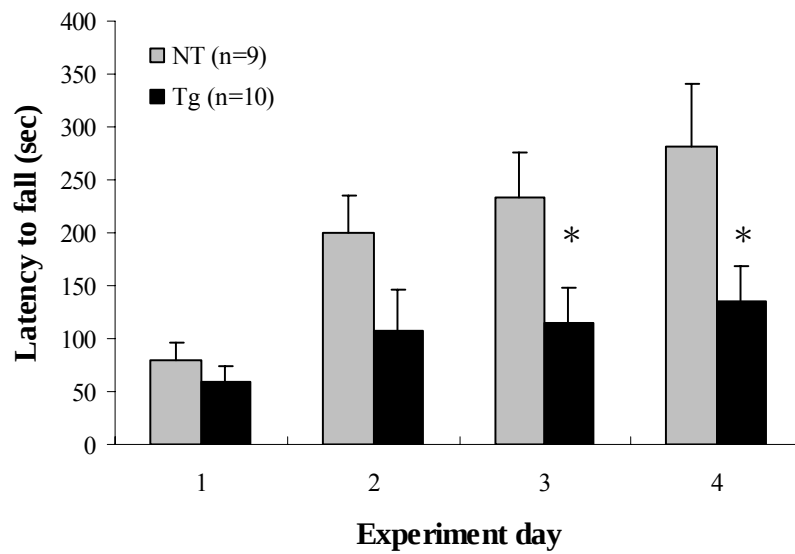


C.

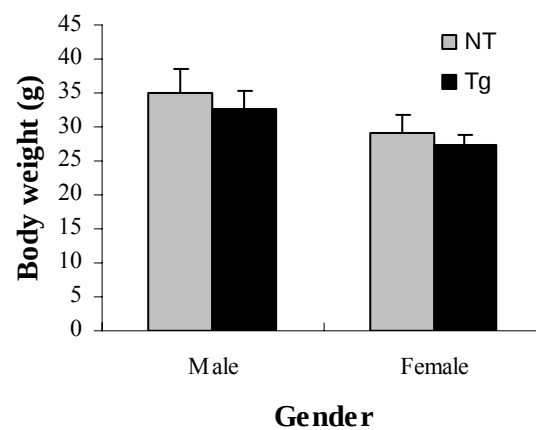


圖十四、*hTBP109Q* line-16 行為分析結果 (NT : $n \geq 10$, Tg : $n \geq 10$)。A. 由 rota-rod 分析圖可知，2 個月到 18 個月大之基因轉殖小鼠其表現與非基因轉殖小鼠之間均未達顯著差異。B. 分析小鼠拉力強度，發現 2 個月到 11 個月大之基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠其拉力強度之間均未出現差異。C. 分析小鼠不同年齡之體重，line-16 基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之間亦無差異。實驗數據以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。

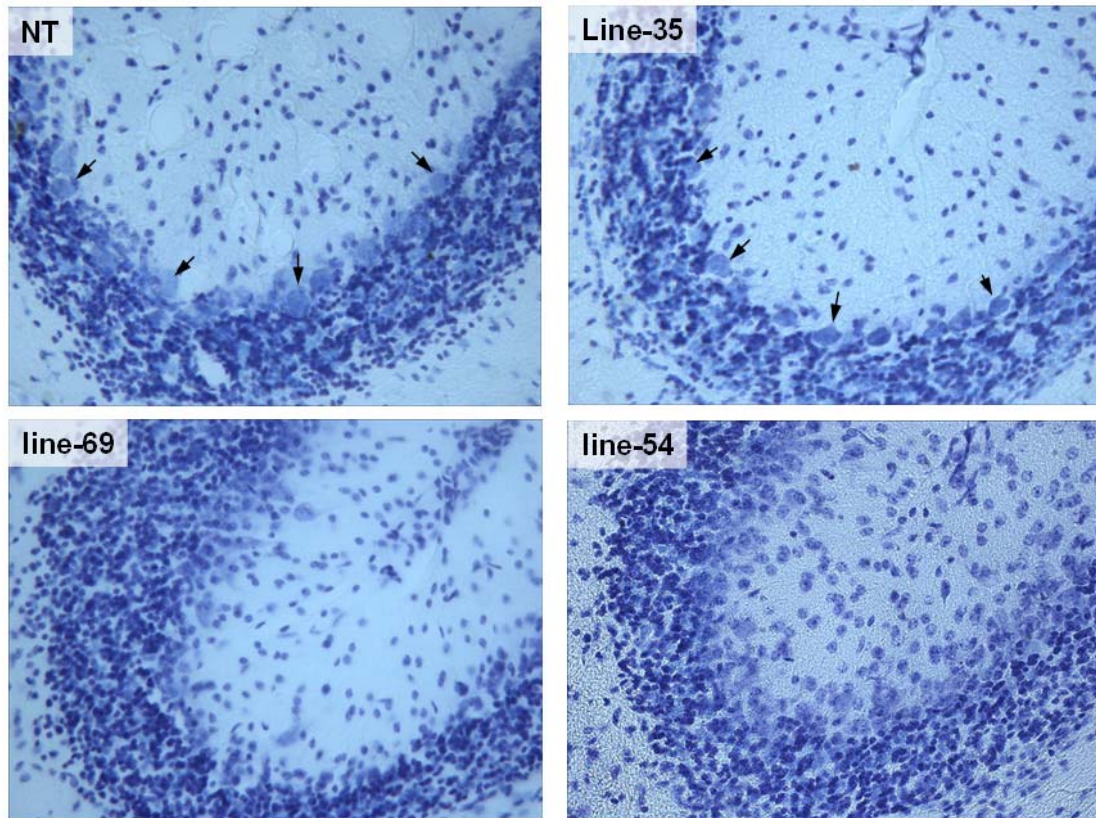
A.



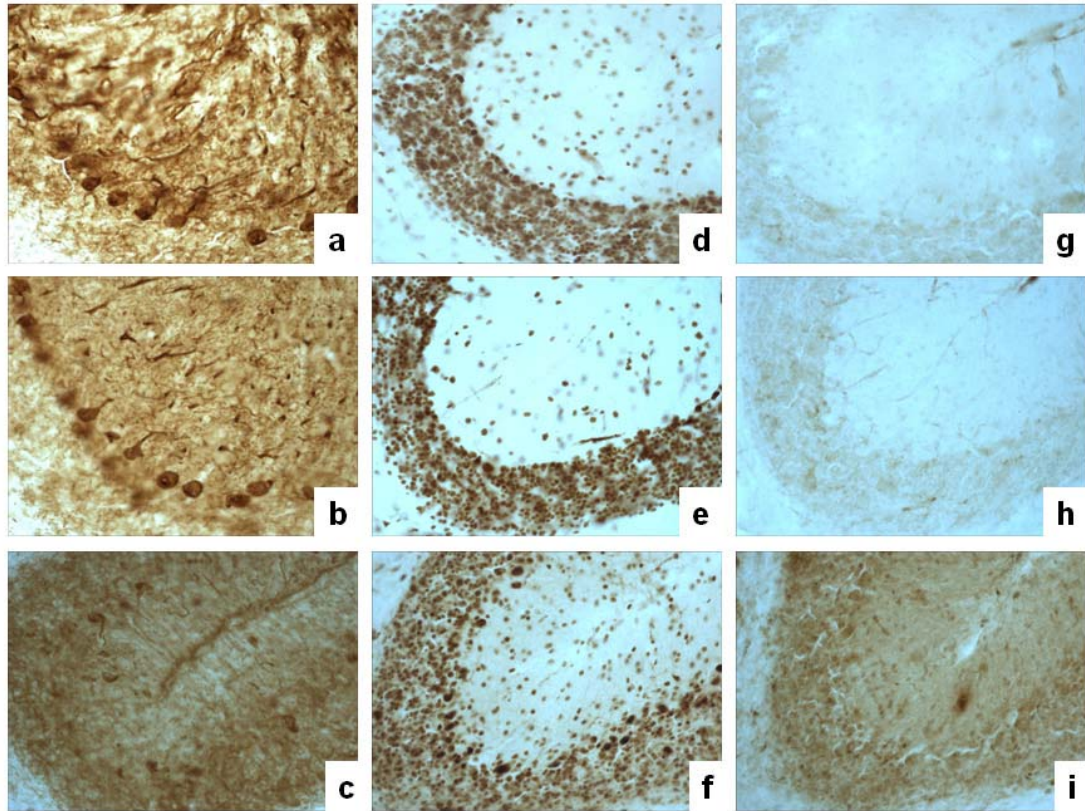
B.



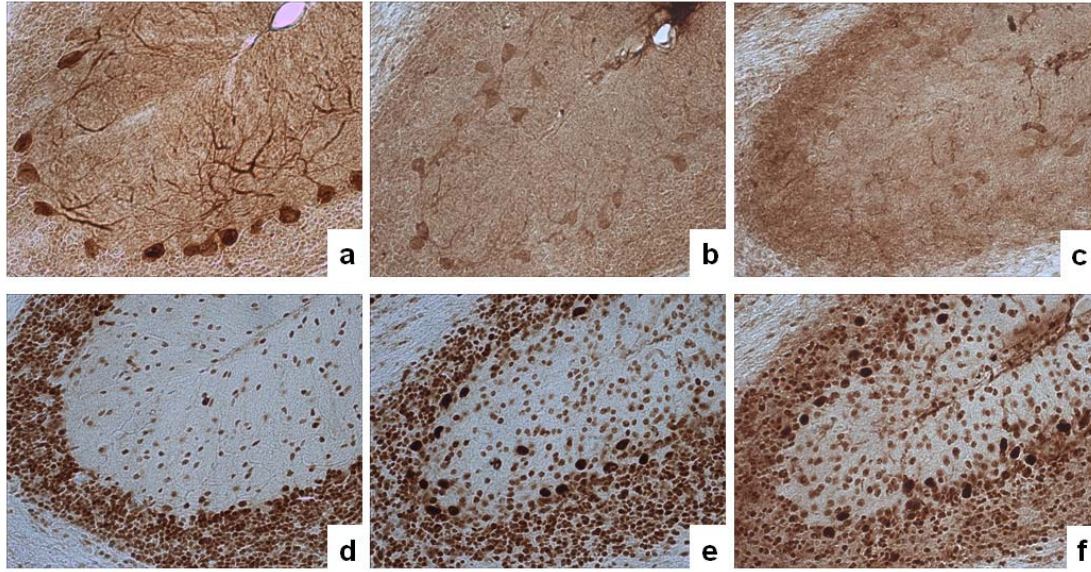
圖十五、*hTBP109Q* line-54 行為分析結果。A. 由 rota-rod 分析發現基因轉殖小鼠之表現較差，第 3 天和第 4 天之測試結果基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠之表現呈顯著差異，* $p < 0.05$ 。B. 分析小鼠體重，line-54 基因轉殖小鼠與非基因轉殖小鼠在 6 個月大之體重之間並無顯著差異。實驗數據以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。



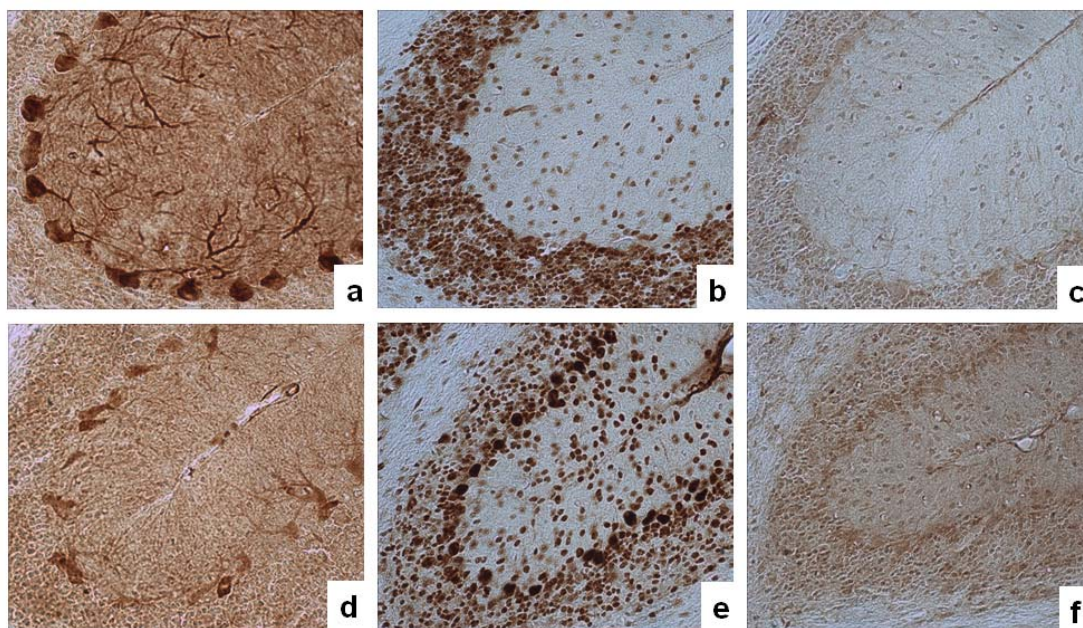
圖十六、*hTBP* 基因轉殖小鼠小腦組織切片 Nissl stain 結果，箭頭表示 Purkinje cell 位置，在 FVB 與 *hTBP36Q* line-35 小鼠小腦中之 Purkinje cell 數量與形態均正常，*hTBP109Q* line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠之小腦中則幾乎找不到 Purkinje cell。(NT：non-transgenic mice。放大倍率：400×)



圖十七、15 個月大之 *hTBP* 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 結果，橫排由上而下分別為 FVB (a, d, g), *hTBP36Q* line-35 (b, e, h), *hTBP109Q* line-69 (c, f, i)。抗體由左至右分別為 calbindin, TBP (N-12), 1C2。由 calbindin 染色發現 *hTBP109Q* line-69 基因轉殖小鼠小腦中 Purkinje cell 數量明顯減少 (C)。TBP (N-12)與 1C2 單株抗體染色結果中，FVB、*hTBP36Q* line-35 與 *hTBP109Q* line-69 小腦呈現之訊號未出現明顯差異。(放大倍率：400×)



圖十八、hTBP 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 圖。縱排由左至右分別為 FVB (a, d), hTBP109Q line-69 基因轉殖小鼠 (b, e), hTBP109Q line-54 基因轉殖小鼠 (c, f), 小鼠年紀為 6 個月大。上排為 calbindin 抗體染色結果, 下排為 TBP (N-12) 抗體染色結果。由 calbindin 染色結果可發現在 FVB 小鼠腦中 Purkinje cell 分布與型態非常完整, 然而 line-69 與 line-54 基因轉殖小鼠小腦中 Purkinje cell 型態與數量均呈現受損情況。由 TBP (N-12) 抗體染色結果可觀察到有體積較大且染色較深的細胞, 顯示基因轉殖 hTBP 的確可在 Purkinje cell 中表現。(放大倍率: 400×)



圖十九、三個月大之 *hTBP* 基因轉殖小鼠小腦免疫組織染色 (IHC) 圖。上排為 FVB 小鼠之小腦切片 (a, b, c)，下排為 line-69 基因轉殖小鼠之小腦切片 (d, e, f)，縱排由左至右分別為 calbindin, TBP (N-12), 1C2 抗體染色結果。由 calbindin 染色結果顯示 line-69 基因轉殖小鼠小腦之 Purkinje cell 已出現受損情況，同時由 TBP (N-12) 染色結果可觀察到在 Purkinje cell 中有大量 TBP 之訊號，在 1C2 抗體染色部分則未觀察到有蛋白質不正常聚積之情況。(放大倍率：400×)