

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

第五型類細胞週期蛋白依賴型激酶缺失小鼠的

神經化學與行為表型分析

Behavioral and neurochemical phenotyping in mice lacking
cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)

研究生：高方淇

指導教授：廖文霖 博士

中華民國 103 年 6 月 24 日

本研究榮獲財團法人罕見疾病基金會
「第十五屆罕見疾病博碩士論文獎助學金」獎助

謹於此特別致謝

謝誌

終於，到了寫謝誌的時刻。

兩年的研究所生涯，對我影響最大的就是我的指導教授—廖文霖老師，無論在課業或實驗上，老師總是悉心指導。此外，非常感謝口委老師們—陳景宗老師、李宏鎰老師、薛一蘋老師以及賴文崧老師，謝謝老師們抽空參與我的論文口試並提出精湛見解，讓這份論文更加完備。

感謝所上趙知章老師與學妹焙琮，在實驗技術及儀器上的幫忙。最重要的，莫過於人美心更美的于姐，我永遠記得當初當初的一席話，讓我下定決心。真的很感謝于姐這段時間的鼓勵與陪伴，有你在的地方永遠是我們的娘家。

謝謝阿三、丸子、鉉豐和禎廷，從我還是專題生時就非常照顧我，慶幸有你們，才能熬過可怕的碩一生活。謝謝芊澐和宇銘，一起熬夜讀書趕報告、讀累了還半夜看流星的日子，現在還有點懷念。當然不能忘了同實驗室的弈博，謝謝你在我趕實驗論文的階段，幫我分擔許多事情，讓我可以無後顧之憂地趕進度，希望我們這屆每個人都可以順順利利朝著自己的夢想前進；謝謝學妹庭凰，在最後修改論文時，幸好有你陪我聊天紓壓，預先祝福你未來實驗順利。

謝謝一直默默支持著我的家人，原諒我無法常常回去陪你們，甚至有時打電話也常找不到人，但你們總是在我最低落時，給予我最暖的鼓勵與體諒。還有許多尚未被提及但卻深刻留在我記憶裡的人，謝謝你們的幫忙與照顧。

最後的最後，感謝在實驗上犧牲的老鼠們，讓我可以完成我的實驗。我畢業了！！！！

中文摘要

第五型類細胞週期蛋白依賴激酶(Cyclin-dependent kinase like 5, CDKL5)為一種絲胺酸/蘇胺酸蛋白磷酸激酶。此基因之突變會造成許多神經發育疾病，其中包含泛自閉障礙 (autism spectrum disorders, ASD)。為了瞭解 CDKL5 基因突變所造成的大腦與行為改變，本研究進行 *Cdkl5* 缺失小鼠的行為表型與神經化學分析。我們首先檢測缺少 CDKL5 是否造成泛自閉障礙之行為表徵，結果發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較明顯的重複性挖掘墊料之刻板行為，並且明顯花費較少時間與陌生小鼠互動，顯示其在社會互動與社交偏好之能力有所缺失。此外，測量母鼠誘發之超音波鳴叫 (ultrasonic vocalization) 發現，*Cdkl5* 基因剔除小鼠產生較少的總鳴叫次數與時間，顯示其社交溝通之能力之障礙。值得注意的是，*Cdkl5* 基因剔除小鼠之敞箱活動力遠高於野生型小鼠。有鑑於泛自閉障礙與注意力不足過動症(Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)之間的高共病率，因此我們檢驗 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否也表現 ADHD 之其他行為表徵。結果顯示，突變鼠相較於正常鼠有較高的衝動性與攻擊行為，且在空間學習的認知表現中有較差的學習曲線，可能是由於注意力異常所導致。我們進一步檢測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中神經化學的改變，發現其在紋狀體與前額皮質的多巴胺含量有明顯改變，並伴隨相應之多巴胺合成酶與代謝酶蛋白質含量之變化。此外，我們也發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在 ASD 與 ADHD 相關蛋白質的表現量隨腦區而有不同程度的差異。最後，我們測試目前廣泛用於治療 ADHD 患者的心理興奮劑利他能是否可以改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之行為症狀，發現此藥物可能藉由增加前腦多巴胺的含量進而改善 *Cdkl5* 突變小鼠之過動與刻板行為。綜上所述，本研究探討了 CDKL5 缺失在多巴胺系統上的影響，並提供一個 ASD 與 ADHD 共病之動物模式，可望成為未來藥物篩選之平台。

關鍵字：自閉症，注意力不足過動症，第五型類細胞週期蛋白依賴激酶，多巴胺，紋狀體，前額皮質

Abstract

Cyclin-dependent kinase-like 5 (*CDKL5*) is a X-linked gene encoding a putative serine-threonine kinase. Mutations of *CDKL5* have been implicated in many neurodevelopmental disorders including autism spectrum disorders (ASD). To understand the neural basis of disorders caused by *CDKL5* mutations, we studied the behavioral and neurochemical phenotypes in mice lacking *CDKL5*. To confirm whether loss of *CDKL5* causes autistic features, we examined repetitive behavior of *Cdkl5*^{-/-} mice and found that they kept digging the bedding matrix showing dramatically increased motor stereotypy. Besides, in a three-chamber social test, the *Cdkl5*^{-/-} mice spent less time to interact with stranger mice, showing deficits in sociability and social preference. We also found significant impairments of female-induced ultrasonic vocalization in adult male *Cdkl5*^{-/-} mice. In addition to the ASD-like phenotypes, *Cdkl5*^{-/-} mice showed hyperactivity in an open-field test compared with their wild-type littermates. Based on the high comorbidity between ASD and attention-deficit hyperactivity disorders (ADHD), we further investigated whether *Cdkl5*^{-/-} mice exhibit other core symptoms of ADHD. We found enhanced impulsivity and aggressiveness in adult male *Cdkl5*^{-/-} mice. In addition, they showed deficiency in acquisition of cognitive spatial learning task. To access neurochemical alterations, we found disrupted dopamine content in the striatum and medial prefrontal cortex of *Cdkl5*^{-/-} mice associated with corresponding alterations in protein expression for dopamine biosynthesis and metabolism, as well as changed expression of ASD- and ADHD-associated proteins. Notably, we found that Ritalin®, a psychostimulant clinically used in treatment of ADHD, could normalize the hyperactivity and stereotypy in *Cdkl5*^{-/-} mice via enhancing dopamine content in specific regions of the forebrain. Altogether, this study reveals a previously unidentified function of *CDKL5* in modulation of dopaminergic neurotransmission system, also provides a potential treatment for stereotypic behavior in ASD and establishes a conceivable mouse model for comorbid ADHD and ASD.

Keywords : ASD , ADHD , *CDKL5* , dopamine , striatum , medial prefrontal cortex

目錄

謝誌.....	II
中文摘要	III
英文摘要	IV
目錄.....	V
圖次.....	VIII
縮寫對照表.....	IX
第一章 緒論	1
第一節 第五型類細胞週期蛋白依賴激酶(cyclin-dependent kinase-like 5,CDKL5)	1
一、CDKL5 基因結構與表現分布	1
二、CDKL5 在神經系統之功能	1
第二節 CDKL5 相關之疾病	2
第三節 發展障礙	3
一、泛自閉症障礙 (autism spectrum disorders, ASD).....	3
二、注意力不足過動症 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD).....	4
第四節 多巴胺系統與行為異常	5
第五節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠	6
第六節 實驗目的與策略.....	6
第二章 材料與方法	8
第一節 實驗動物	8
第二節 基因型鑑定.....	8
一、基因組 DNA 之萃取.....	8
二、 <i>Cdkl5</i> 突變小鼠之基因型鑑定	9
第三節 小鼠之行為測試	9
一、三隔間社交偏好實驗 (three chamber social preference test)	9
二、母鼠誘發之成鼠超音波鳴叫 (female-induced ultrasonic vocalizations) .	10
三、apomorphine 誘發之刻板行為 (apomorphine-induced stereotypy)	10
四、敞箱實驗 (open field test, OFT)	11

五、居留者-入侵者實驗 (resident-Intruder Test)	11
六、巴奈氏迷宮 (Barnes maze)	12
第四節 藥物之治療效果	12
一、甲基安非他命(methamphetamine)	12
二、利他能(Ritalin)	13
第五節 多巴胺含量之分析	14
第六節 蛋白質表現之分析	15
一、蛋白質定量	15
二、西方點墨法	15
三、蛋白質表現之定量方法	16
第三章 結果	19
第一節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現類似 ASD 三大核心症狀之異常行為	19
第二節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現過動、衝動與學習障礙	24
第三節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中多巴胺含量有所改變	29
第四節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中多巴胺合成及代謝蛋白含量之表現	29
一、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中多巴胺合成酶之含量有所改變	29
二、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中多巴胺代謝酶之含量有所改變	30
第五節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在 ADHD 相關蛋白之表現	35
第六節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中 ASD 相關蛋白之表現	38
第七節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在興奮性突觸相關蛋白之表現	41
第八節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在抑制性神經元相關蛋白之表現	44
第九節 甲基安非他命可改善 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠之過動症狀	47
第十節 利他能可改善 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠之部分症狀	49
一、利他能劑量之選擇	49
二、利他能可有效改善 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠過動之症狀	50
三、利他能可有效改善刻板行為	51
四、利他能無法改善社交溝通障礙	52
第十一節 利他能造成腦中多巴胺之改變	58

第四章 討論	60
第一節 <i>Cdkl5</i> 基因缺失造成大腦多巴胺系統之改變	60
第二節 <i>Cdkl5</i> 基因缺失導致 ASD 相關之行為症狀與基因表現之改變	61
第三節 <i>Cdkl5</i> 基因缺失導致 ADHD 相關之行為症狀與基因表現之改變	62
第四節 利他能治療效果之探討	64
第五節 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠可能為 ASD 與 ADHD 共病之模式小鼠	65
第五章 結論	68
附錄一、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠之基因型鑑定。	69
附錄二、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在大腦缺少 CDKL5 蛋白。	70
參考文獻	71



圖 次

圖一、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現出較差的社會互動能力。	21
圖二、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在社交溝通的表現有明顯缺失。	22
圖三、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現較多挖掘墊料之刻板行為。	23
圖四、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現過動之症狀。	26
圖五、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現較高之攻擊性及較差之衝動控制力。	27
圖六、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠表現較差之空間學習能力，但具有正常的短期與長期記憶。	28
圖七、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺含量有明顯改變。	32
圖八、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺合成酶之表現量。	33
圖九、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺代謝酶之表現量。	34
圖十、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠全腦各區 ADHD 相關蛋白之表現。	37
圖十一、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠全腦各區在 ASD 相關蛋白之表現。	40
圖十二、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在興奮性突觸相關蛋白之表現。	43
圖十三、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在抑制性神經元相關蛋白之表現。	46
圖十四、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠在投予不同劑量之甲基安非他命後於敞箱活動能力之表現。 .	48
圖十五、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠投予不同劑量之利他能後於敞箱活動力之表現。	53
圖十六、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠投予利他能後長時間之藥物效果。	54
圖十七、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠投予利他能後改善過動之症狀。	55
圖十八、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠投予利他能後改善其挖掘墊料之刻板行為。	56
圖十九、 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠投予利他能後無法改善社交溝通之障礙。	57
圖二十、投予利他能後造成腦中多巴胺含量之改變。	59
圖二十一、CDKL5 蛋白對多巴胺神經元之影響及 <i>Cdkl5</i> 基因剔除小鼠腦中 ASD, ADHD 相關蛋白改變與症狀之對應。	67

縮寫對照表

ASD	autism spectrum disorders
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder
Cbll	cerebellum
CDKL5	cyclin-dependent kinase-like 5
COMT	catechol-O-methyltransferase
CTX-r	rostral cortex
DAT1	dopamine transporter
DRD2	dopamine D2 receptor
DRD4	dopamine D4 receptor
DDC	DOPA decarboxylase
FoxP2	forkhead box protein P2
GAD1	glutamic acid decarboxylase 1
GAD2	glutamic acid decarboxylase 2
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
MAOA	monoamine oxidase A
Hip	hippocampus
MAOB	monoamine oxidase B
mPFC	medial prefrontal cortex
NAc	nucleus accumbens
NL1	neuroligin 1
NL2	neuroligin 2
PSD95	postsynaptic density protein 95
pTH-Ser40	p-Ser ⁴⁰ tyrosine hydroxylase
ST-r	rostral striatum
ST-c	caudal striatum
TH	tyrosine hydroxylase
VMB	ventral midbrain
vMAT2	vesicular monoamine transporter 2
vGluT2	vesicular glutamate transporter 2
vGaT	vesicular GABA transporter

第一章 緒論

第一節 第五型類細胞週期蛋白依賴激酶(cyclin-dependent kinase-like 5, CDKL5)

一、CDKL5 基因結構與表現分布

CDKL5位於X染色體短臂22位置，負責製造一種絲胺酸/蘇胺酸蛋白磷酸激酶 (serine/threonine kinase)。CDKL5基因由24個外顯子所組成，前三個外顯子1、1a、1b為未轉譯區，剩餘21個外顯子包含基因編碼區。後續研究發現在病患身上找到位於5'端未轉譯區有兩個剪接變異體 (splice variant)，其中之一剪接變異體為包含外顯子1，且轉錄在大部份的組織中；然而另一個剪接變異體則包含外顯子1a與1b，但只表現在睪丸與胚胎腦中(Kalscheuer *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2012)。

CDKL5 mRNA在成人與啮齒類的大腦大量表現(Montini *et al.*, 1998)。在發育中的鼠腦直到形成胚胎後16.5天(embryonic day 16.5, E16.5)表現量均非常的低，但自此開始表現量逐漸增加，直到出生後14天(postnatal day 14, P14)達到高峰，接著便緩慢趨於穩定。成鼠的大腦中又以前端腦區表現量最多，如大腦皮質、紋狀體與海馬迴(Wang *et al.*, 2012)，此外CDKL5只表現在神經元，而無法於星狀膠細胞偵測到(Rusconi *et al.*, 2008)。

二、CDKL5 在神經系統之功能

鑑於CDKL5只分布於神經細胞，顯示CDKL5可能在神經元的發育與功能扮演著重要的角色。為探討CDKL5在神經元的功能，研究利用核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi)抑制培養中皮質神經元的CDKL5蛋白質表現，結果發現神經突生長(neurite growth)以及樹突分支(dendritic arborization)被明顯抑制；而過量表現CDKL5蛋白質則得到相反之結果，進一步發現CDKL5會與Rac1結合形成一個蛋白質複合體，而Rac1為一種控制肌動蛋白重塑(actin remodeling)與神經元的形態發生(neuronal morphogenesis)的分子，因此若缺少CDKL5的情況下，CDKL5無法與Rac1形成複合體，進而影響神經元的形態發育(Chen *et al.*, 2010)。

除了影響神經元的形態發育外，CDKL5也參與神經元上的特化結構「突觸」的

形成。在離體實驗發現，若缺少CDKL5會抑制興奮型突觸小棘的形成與生長，顯示CDKL5在突觸發育中扮演重要的角色(Zhu *et al.*, 2013)，其背後的機制為，CDKL5藉由磷酸化細胞黏著分子netrin-G1 ligand(NGL-1) Ser631的位點，使NGL-1可以與postsynaptic density protein 95(PSD95)結合，進而有助於突觸的形成(Raymond *et al.*, 2013)。

除了探討CDKL5在中樞神經的功能外，基於CDKL5為一磷酸激酶，科學家開始著手尋找CDKL5的下游分子，藉此了解其作用機制。近期研究發現其中一下游分子為amphiphysin 1，在大腦中負責神經元的發育及傳輸，主要是由於CDKL5會藉由磷酸化amphiphysin 1的Ser-293位點，使其具有正常功能。若此位點產生突變，實驗結果發現，amphiphysin 1與endophilin親和力會大量減少，而endophilin為一蛋白參與突觸囊泡的胞吞作用，最後造成神經傳輸(neuronal transmission)的減少(Sekiguchi *et al.*, 2013)。有鑒於CDKL5對於突觸的結構形成與功能之影響，顯示當CDKL5失去功能時，可能會影響腦中神經傳遞物質的恆定，但這部分仍很少研究深入探討。

第二節 CDKL5 相關之疾病

目前在臨床上發現 CDKL5 的突變可能與下述疾病有關，如第二型新生兒癲癇性腦病(early infantile epileptic encephalopathy 2)(Kramer *et al.*, 2011)、非典型瑞特氏症(atypical Rett syndrome)(Weaving *et al.*, 2004; Chahrour & Zoghbi, 2007)與泛自閉症障礙(autism spectrum disorders) (Sakai *et al.*, 2011; Talkowski *et al.*, 2012)。帶有CDKL5 突變的病患通常表現出較嚴重的早發性癲癇(early-onset seizures)、智能障礙(intellectual disability)與自閉症相關症狀(autistic features)(Bahi-Buisson *et al.*, 2008)。截至目前為止，已有至少 25 個突變位點被報導，但關於 CDKL5 基因突變與臨床症狀診斷相關研究卻仍是少數。值得注意的是，被報導出可能肇因於 CDKL5 突變的疾病，多數屬於發展障礙 (developmental disorders)，呼應先前所提到 CDKL5 對於神經細胞之發育不可或缺。

第三節 發展障礙

發展障礙是指病患於孩童發育階段出現病徵，其中又以廣泛性發育障礙(pervasive developmental disorder, PDD)最普及，廣泛性即為這些症狀對於孩童發展過程中各層面的影響，其中包含：語言障礙、學習障礙、運動障礙以及較廣為人知的泛自閉症障礙(autism spectrum disorders)。而在第五版精神疾病診斷與統計手冊中(DSM-V)，已將注意力不足過動症 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)歸類至發展障礙中。

一、泛自閉症障礙 (autism spectrum disorders, ASD)

ASD 為一因腦部功能不正常而導致的發展障礙，患者大部分在三歲左右發病，症狀主要包含社交及溝通障礙，並出現重複性的刻板行為。其症狀的表現會因年齡、智商以及 ASD 的嚴重程度而有所不同，盛行率約為千分之十四點七，即 68 名小孩中就會有一名罹患自閉症，男女比約為 4-5 比 1(Kogan *et al.*, 2009)。

目前關於 ASD 的病因仍是未知，但家族及雙胞胎研究發現同卵雙胞胎有 60-90%、異卵雙胞胎有 10%以及手足間 5-10%的疾病同現率 (concordance rate) (Fombonne, 2004)，顯示基因缺陷可能是 ASD 病因之一。後續研究也發現 ASD 與許多基因的突變有關，研究發現 Neuroligin(NL)之基因缺陷會擾亂神經元之訊息傳遞。Neuroligins (NLs)家族共有 NL1-NL5，屬於突觸後細胞黏著蛋白 (cell adhesion protein)，與突觸前的 β -Neurexins 結合，使兩個神經元可以連接進而形成突觸 (Chubykin *et al.*, 2005)。其中 NL 3 和 NL 4 已被報導為自閉症之致病基因(Jamain *et al.*, 2003)，在後續研究中所建立的 Neuroligin 基因剔除小鼠，確實表現出部分泛自閉症障礙之症狀 (Tabuchi *et al.*, 2007; Jamain *et al.*, 2008)。此外，關於泛自閉症障礙中的語言障礙，研究發現 FoxP2 Knockin 小鼠在與母鼠分離的超音波叫聲有明顯的減少，並伴隨小腦中 Purkinje 細胞不正常的改變(Fujita *et al.*, 2008)；而後續的研究更進一步指出，FoxP2 是經由參與大腦皮質—基底核迴路(cortico-basal ganglia circuits)來影響語言的發展(Enard, 2011)。

二、注意力不足過動症 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)

ADHD 是一種長期的神經生理疾病，學齡期的 ADHD 盛行率約 5~7%，男女比大約 9 比 1，而青春期的比率約為 2-3 比 1，且約在七歲前就有明顯症狀，半數以上會持續到成年以後 (Applegate *et al.*, 1997)。而目前臨床診斷之三大標準分別如下：(1) 活動量過多(hyperactivity)、(2) 衝動(impulsivity)和 (3) 注意力不易集中(inattention)。

雖然目前對於 ADHD 病因仍無明確的答案，但許多研究證據都指出兒茶胺類(catecholamine)神經傳遞物質的不平衡參與其中(Faraone & Biederman, 2002)。兒茶胺類神經傳遞物質包含：多巴胺(dopamine)、正腎上腺素(norepinephrine)和腎上腺素(epinephrine)，其中又以多巴胺神經傳遞物質與注意力不足過動症最密切相關，原因如下：

1. 作用於多巴胺系統上的興奮劑藥物可以有效改善 ADHD 之症狀(Zametkin & Rapoport, 1987; Amara & Kuhar, 1993)，目前 ADHD 之藥物可分為兩類，首先為中樞神經興奮劑，包含 dextroamphetamine/amphetamine (Adderal I)、dextramphetamine (Dexedrine)與 methylphenidate (Ritalin 及 Concerta)，台灣目前僅核准使用 Ritalin 及 Concerta，這類型的藥物主要經由抑制腦中多巴胺與正腎上腺素的再回收，也可經由增加單胺類(monoamine)神經傳遞物質釋放到細胞外，增加自主神經系統的活性達到中樞神經興奮的作用；其二是選擇性正腎上腺素再回收抑制劑(selective norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI)，如 Atomoxetine (Strattera)，是當中樞神經興奮劑治療效果不佳時才使用的第二線藥物。
2. 腦造影相關研究也發現 ADHD 病患在多巴胺系統相關分子有所變化，使用單光子電腦斷層攝影 (single photon emission computed tomography, SPECT)發現與同年齡的控制組相比，ADHD 病患在多巴胺轉運子密度有近 70%的增加 (Dougherty *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 2000; Faraone & Biederman, 2002)。除了分子蛋白活性的改變外，在大腦結構方面，從腦部核磁共振攝影 (magnetic

resonance imaging, MRI) 研究結果發現，ADHD 病患在腦中基底核(basal ganglia)與胼胝體(corpus callosum)較同年齡正常孩童小(Castellanos *et al.*, 2002)。使用功能性磁振造影(functional magnetic resonance imaging, fMRI)發現，ADHD 病患在前額皮質腦區的血流量較低，顯示此腦區功能較低下(Rubia, 2002)。

3. 在多巴胺系統相關之基因上有所缺失的動物模式，具有 ADHD 之症狀(Amara & Kuhar, 1993; Russell *et al.*, 1995; Caron, 1996; Jaber *et al.*, 1999)。有鑑於治療藥物作用於多巴胺轉運子上，多巴胺轉運子剔除小鼠為第一個被報導是 ADHD 之動物模式，此基因剔除小鼠表現出過動與學習記憶障礙(Caron, 1996)。此外 dopamine D4 receptor (DRD4) 剔除小鼠也被發現具有 ADHD 之過動與行為抑制缺失之症狀(Avale *et al.*, 2003)。

第四節 多巴胺系統與行為異常

多巴胺是一種兒茶胺類的神經傳導物質。在腦中，多巴胺除了作為神經元間的神經傳遞物質，在酬賞機制 (Ikemoto, 2007)中扮演重要角色外，也參與動機與學習 (Wise, 2004)、認知能力 (Nieoullon, 2002)、運動控制 (Dunnett & Lelos, 2010)、社會互動 (Burgdorf & Panksepp, 2006)、語言能力 (Dastur *et al.*, 1999)以及攻擊行為 (Harrison *et al.*, 1997)。目前已知多巴胺系統的神經迴路如下：

1. 黑質-紋狀體路徑 (nigrostriatal pathway)：此路徑從中腦黑質(substantia nigra)投射到紋狀體(striatum)，主要與運動控制有關。
2. 中腦-邊緣系統路徑(mesolimbic pathway)：由中腦的腹側被蓋區(ventral tagmental area, VTA) 投射到邊緣系統中的阿控伯氏核 (nucleus accumbens, NAc)。這條神經迴路主要和藥物成癮與人類愉悅感有關。
3. 中腦-皮質路徑(mesocortical pathway)：由中腦 VTA 投射到大腦前額皮質(frontal cortex)，此迴路主要參與調控認知行為能力、動機以及情緒反應。
4. 結節-漏斗部路徑 (tuberoinfundibular pathway)：由下視丘(hypothalamus)投射

到腦下垂體(pituitary gland)；這條路徑跟泌乳激素的分泌控制較有關。

值得注意的是，許多在神經系統有所缺失的疾病都與多巴胺系統之功能息息相關，如神經退化性疾病-帕金森氏症(Parkinson's disease)，即肇因於黑質的多巴胺神經元壞死，使細胞無法正常分泌多巴胺，因此產生手部顫抖、動作遲緩等症狀；但若多巴胺系統的過度活化，則是造成精神分裂(schizophrenia)正性症狀的主要原因。此外像是 ADHD(如前述)以及下肢不安症候群(restless legs syndrome) (Turjanski *et al.*, 1999)也被認為與多巴胺活性降低有關。近期研究則發現，多巴胺系統的相關分子也參與 ASD 的核心症狀，例如：多巴胺受體 *DRD3* 基因上的突變與 ASD 病童的特定固著行為 (Insistence on Sameness) 息息相關 (Staal *et al.*, 2012)；而全外顯子定序(Whole-exome sequencing)的研究在 ASD 家族中找到了一個新的突變位點，以此突變位點而建立出來的果蠅模式，也表現出許多 ASD 的症狀。

第五節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠

CDKL5 的研究多數以離體實驗為主，截至目前為止，以動物活體做為研究對象的文獻只有兩篇。首先，第一個 *Cdkl5* 基因剔除小鼠於 2012 年被報導出來，此小鼠基因突變的位點與病患相同，表現出活動力增加、社交能力低落、築巢分數下降、前後腳蜷縮以及在恐懼制約實驗中(fear conditioning)有學習及記憶缺失，這些符合先前在泛自閉症障礙之動物模式中發現的症狀。而在海馬迴的事件關連電位(event-related potential, ERP)反應也與控制組小鼠有所不同。分子機制上，缺少 CDKL5 蛋白會降低 AKT 與 mTOR 的磷酸化，進而影響 AKT-mTOR 訊號迴路(Wang *et al.*, 2012)。

其次，第二個關於 *Cdkl5* 突變小鼠研究則由義大利報導出來，他們所建立的條件式 *Cdkl5* 基因剔除小鼠模式(*Cdkl5* conditional knockout mouse)為前腦興奮性或抑制性的神經元缺少 CDKL5 蛋白，他們發現這些條件式基因剔除小鼠具有運動低下(hypoactivity)、四肢蜷縮以及不正常的眼動追蹤。而在細胞形態的分析，則發現在皮質的神經元有樹突分支減少的現象(Amendola *et al.*, 2014)。

第六節 實驗目的與策略

基因遺傳是發展障礙的主要原因之一，探討特定基因在人類疾病中所扮演的角色時，動物模式是一個必備的研究工具，而一個適當的動物模式應具備表面效度、建構效度及預測效度 (Nestler & Hyman, 2010)。目前關於 CDKL5 的研究仍以細胞培養實驗為主，極少數使用活體動物模式進行研究。因此本研究以表面、建構及預測三大效度為基礎，進行 *Cdkl5* 基因剔除小鼠行為與神經化學的表型分析。實驗策略如下：

1. 表面效度(face validity)：評估 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之行為表徵與病患的相似度。首先測量在 ASD 的三大症狀—語言障礙、重複行為與社交障礙，彌補先前研究的缺口。此外，由於在 ASD 患者中，70-84%會與其他疾病共病(comorbid)，其中又以 ADHD(29%)為主，因此本研究同時分析 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否表現類似 ADHD 之主要症狀—活動量過多、衝動與注意力不易集中。
2. 建構效度(construct validity)：評估 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之腦中分子層面的變化與病患間的相似性。首先將確認本研究所使用之 *Cdkl5* 基因剔除小鼠確實缺乏 CDKL5 蛋白，以及此缺失於全腦之分佈。此外，將利用高效能液相層析儀 (High-performance liquid chromatography, HPLC)與西方墨點法(Western blotting)分析突變小鼠腦中特定神經傳遞物質和蛋白質之變化，藉此探討症狀之成因。
3. 預測效度(predictive validity)：評估目前臨床用藥對 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之治療效果與疾病的相似度。本研究依照在行為與神經化學的表型分析結果，嘗試不同藥物在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之治療效果，並探討其療效背後可能的機制。

第二章 材料與方法

第一節 實驗動物

本研究採用之 *Cdkl5* 突變小鼠為利用同源染色體互換 (homologus recombination) 之原理，在小鼠胚胎幹細胞中外顯子六(exon 6)的位置插入 loxP 序列，當遇到 Cre 基因重組酶時，此段基因將被刪除，於 N 端形成一個 TAA 的終止序列，因此 *Cdkl5* 基因外顯子六之後便停止轉錄(Wang et al., 2012)。

上述之 *Cdkl5* 異合子(heterozygote, *Cdkl5*^{+/-})母鼠自賓州大學動物中心取得後，與購自於國家實驗中心之 C57/BL6J 品系野生型公鼠雜交，取得本研究中所使用之 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (如表一)。飼養小鼠之動物房設立於本校神經科學研究所神經發育實驗室，小鼠均飼養於獨立通氣式飼養籠(Individually ventilated cage, IVC)中，動物房室溫維持在攝氏 22 ± 2 度，晝夜週期為 12 小時循環(上午 8 點至下午 8 點為白晝)，實驗期間提供動物受試充足的食物和飲水。本實驗除了居留者-入侵者研究 (resident-intruder test)使用 11-16 週大之公鼠外，其餘行為測試及生化分析皆使用 4-6 週大的公鼠。

表一、本實驗所使用小鼠之基因型

親代母鼠 親代公鼠		<i>Cdkl5</i> ^{+/-}	
		+	-
C57BL/6 野生型	+	+/+ (子代母鼠,野生型)	+/- (子代母鼠)
	Y	+/y (子代公鼠,控制組)	-/y (子代公鼠,實驗組)

第二節 基因型鑑定(genotyping)

一、基因組 DNA (genomic DNA)之萃取

從出生後二十一天大的小鼠尾端剪取約 3mm 長之組織，加入 300ul 細胞分解液 (lysis buffer, 含有 0.05M Tris-HCl、0.1M EDTA、0.1M NaCl 和 1% SDS) 與 1.5ul 蛋白酶 K(proteinase K, Amresco) 後，置於 55°C 水浴至少五小時，使組織可以完全溶解。

之後，加入 3ul 核糖核酸酶 A (RNase A, Amresco)，在 37°C 反應 30 分鐘用以去除 RNA。接著加入 100 ul 蛋白質沉澱液 (protein precipitation solution, Promega)，混和均勻後置冰上 5 分鐘，以 13000 rpm 高速離心 10 分鐘，將上清液取至新微量離心管，之後加入同體積的異丙醇(Isopropanol, Sigma)混合均勻，置於冰上 5 分鐘使 DNA 析出，高速離心後除去上清液，接著加入 70% 酒精洗去殘餘的蛋白質，再將酒精完全揮發去除，最後加入 200ul 緩衝液(TE buffer, 含有 10mM Tris-HCl 和 1mM EDTA)，置於 50°C 反應至少兩小時，以利 DNA 回溶，最後將含有基因組 DNA 之溶液保存在 4°C 冰箱。

二、Cdkl5 突變小鼠之基因型鑑定

利用上述 genomic DNA 為模板後，使用 Taq DNA polymerase master mix (Ampliqon) 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。所需引子設計在 *Cdkl5* 基因上，包含前置引子(forward primer, 5'-CCACCCTCTCAGTAAG GCAGCAG-3')及反置引子(reverse primer, 5'-GTCCTTTTGCCACTCAATTCCATC C-3')。PCR 反應條件如下：先進行 95°C 3 分鐘，接著進入 PCR 循環，一個循環包含以下三個反應：(1) DNA 變性反應(denaturation)，於 94°C 反應 30 秒讓雙股螺旋 DNA 解離成單股 DNA；(2) 引子緩冷配對反應(annealing)，於 60°C 反應 40 秒讓引子黏結到目標基因位置；(3) 引子延長反應(extension)，於 72°C 反應 60 秒，合成新 DNA 片段。上述步驟共循環 35 次後，進行 72°C 五分鐘，穩定產物。反應完成後，野生小鼠及 *Cdkl5* 突變小鼠之 PCR 產物分別在 1.5% 電泳凝膠上分離出 653 bp 及 305 bp 之片段 (附錄一)。

第三節 小鼠之行為測試

一、三隔間社交偏好實驗(three chamber social preference test)

本實驗用以測量小鼠的社會互動(sociability)與社交偏好(social preference) 之能力，流程如圖一 A 所示(Moy et al., 2004)。實驗器材為一個區分為三個小區塊(寬 20cm×長 40.5 cm×高 22cm)的壓克力箱，區塊間皆有一個寬為 10 公分的通道。第一階段實驗

中，待測鼠可自由探索三個區塊 5 分鐘；第二階段，在左右區塊交替輪放待測小鼠不熟悉的野生型公鼠(陌生鼠 1)於直徑 10.5 公分高為 11 公分的圓柱體內，並開始觀察 5 分鐘，待測鼠可自由選擇進入有陌生鼠或是空無一物的空間，代表小鼠的社會互動能力。最後，於第三階段實驗中，為測量待測鼠的社交偏好能力，在另一區塊放置一隻新的野生型公鼠(陌生鼠 2)，待測鼠可自由選擇進入有陌生鼠 1 或是陌生鼠 2 存在的空間。三階段的錄影均使用 Smart®軟體進行分析(PanLab, Spain)，分析項目包含總移動距離及在各區塊所停留的時間，最後使用 Student's *t* test 來比較突變鼠與正常鼠之差異。

二、母鼠誘發之成鼠超音波鳴叫 (female-induced ultrasonic vocalizations)

本實驗採用 Scattoni et al (2009)的實驗設計，流程如圖二 A 所示。待測鼠於離乳後以同性且群居方式生活至實驗當天(每籠約 5 至 8 隻)。實驗開始時，待測鼠被放入乾淨透明之塑膠籠中，距離底部 20 公分高處蓋上保麗龍上蓋隔絕外界聲音。保麗龍上蓋正中央為收音之麥克風(avisoft bioacoustics ultraSoundGate 116H, Germany)所在，收音頻率設定只接收 15 至 250 千赫 (kHz)之聲音。首先記錄 5 分鐘待測鼠獨處之超音波鳴叫，接著放入尚未性成熟之野生型母鼠，同樣記錄五分鐘之超音波反應，記錄所得之超音波音訊檔利用 AVISOFT RECORDER software version 4.2 進行事後分析，參數之設定參照(Scattoni et al., 2011)，fast fourier transformation (FFT)設定為 512，time window overlap of 75% (100% Frame, Hamming window)，並設定 lower cut-off frequency 為 20 千赫，以降低背景之雜訊。由於先前研究指出，小鼠鳴叫之頻率為 30 至 110 千赫 (Costantini & D'Amato, 2006; Portfors, 2007)，因此經由軟體所判讀出的每個訊號，將先經由人工判讀刪除落於此頻率範圍之外的雜訊，最後分析每隻待測鼠之音訊檔中鳴叫之總次數(number of calls)與全部鳴叫之總延續時間(duration)，最後使用 Mann-Whitney U test 比較突變鼠與正常鼠之差異。

三、apomorphine 誘發之刻板行為 (apomorphine-induced stereotypy)

本實驗採用 Liao et al (2008)的實驗程序，流程如圖三 A 所示。在實驗前五至六小時，單獨隔離每隻小鼠並更換新的墊料。實驗開始時首先注射食鹽水，在注射後 20 分鐘(Veh-20)時錄影紀錄小鼠的刻板行為 3 分鐘，並在注射後的 50 分鐘(Veh-50)時再次錄影測量 3 分鐘。於注射食鹽水後的 60 分鐘，進行皮下注射 apomorphine (2mg/kg)，並如同上述，在注射後的 20 (Apo-20)、50 分鐘(Apo-50)皆錄影觀察 3 分鐘的刻板行為。實驗結束後，將小鼠放回原本的群居鼠籠。所記錄之 3 分鐘行為影像，在實驗結束之後加以分析，只計算後兩分鐘之行為表現。Veh-20 與 Veh-50 分析項目包含下列：挖掘(digging)與抬頭嗅聞(head-up sniffing)的時間；Apo-20 與 Apo-50 分析項目則為：抬頭嗅聞 (head-up sniffing)與因藥物誘發的低頭嗅聞(head-down sniffing)的時間。最後使用重複量數雙因子變異數分析 (repeated measure two-way ANOVA)來比較突變鼠與正常鼠之差異，並使用 Bonferroni post-hoc test 進行事後檢定。

四、敞箱實驗(open field test, OFT)

本實驗檢測小鼠的開放空間活動力。將待測鼠放入一壓克力透明箱(40 x 40 x 25 cm)，錄影 16 分鐘，使用 Smart®軟體(PanLab,Spain)分析 3 分 30 秒至 15 分 30 秒共 12 分鐘的影像畫面。分析項目包含總移動距離(total traveled distance)、停止不動的時間百分比(% time at resting)、平均移動速度(average speed)和最大移動速度(maximal speed)。最後，使用 Student's *t* test 來比較突變鼠與正常鼠之差異。

五、居留者-入侵者實驗 (resident-Intruder Test)

本行為派典常用於檢測攻擊行為(Gumulka et al., 1969)，流程如圖 5A 所示。11 至 16 週大之公鼠單獨居住一個星期且不更換墊料，以利待測公鼠建立其地域性。實驗程序為先記錄 1 分鐘之活動能力，接著放入年紀與體重相近之野生型的入侵者公鼠(intruder)，錄影記錄 20 分鐘。待測鼠行為之分析項目包含：採取第一次攻擊的延宕時間(latency to first attack)、挖掘墊料(digging) 的時間、主動嗅聞入侵者的時間及攻擊行為之總次數。攻擊行為包含啃咬 (biting)與攀爬 (mounting)，前者為待測鼠主動咬入侵

者身體，後者為待測公鼠上半身壓制入侵者公鼠。統計分析使用 Mann-Whitney U test 來比較突變鼠與正常鼠之差異。

六、巴奈氏迷宮 (Barnes maze)

本實驗主要用於檢驗小鼠之空間學習能力(Barnes, 1979)，流程如圖 6A 所示。實驗程序和原理與水迷津雷同，水迷津是藉由小鼠厭惡游泳的天性，讓其學習找到平台；而巴奈氏迷宮實驗中，小鼠為避免噪音與強光之嫌惡刺激而學會找到躲避區，相較於水迷津的強迫游泳，巴奈氏迷宮對小鼠造成的壓力較小。實驗儀器為一直徑 90 公分，離地約 50 公分之大型不透明圓盤，平均分布 20 個圓孔(直徑 5 公分)，其中只有一圓孔下有躲避區，躲避區為一不透明長方盒(21 x 10 x 7 cm)，並於入口處有一斜坡便於小鼠進入。實驗環境中具有視覺線索以利待測鼠尋找躲避區。每隻待測鼠的躲避區位置固定，但不同待測鼠間的躲避區方向為隨機放置。實驗程序包含為期 3 天，每天 3 個嘗試的訓練，每次嘗試之程序如下：將待測鼠放置於圓盤中央，並罩覆著不透明的塑膠圓筒，於十秒後打開此圓筒，同時開啟強光與噪音(440Hz, 76dB)，待測鼠需學習辨認周遭的視覺線索以找到躲避區。一旦待測鼠進入躲避區，強光與噪音即馬上停止，並記錄其找到躲避區所花費之時間；但若在三分鐘內無法找到躲避區，便以人工誘導至躲避區中，並記錄其延宕時間為三分鐘。待測鼠進入躲避區後，使其於躲避區停留一分鐘，便取出放回籠中直到下次嘗試開始，每個嘗試間隔三十分鐘。實驗開始後的第四天與第十一天進行 probe test，分別測量小鼠的短期與長期記憶。實驗程序同上述之單一嘗試，唯躲避區被移除。實驗結束後，使用 Smart®軟體(PanLab, Spain)分析小鼠移動之軌跡，將圓盤平均分為四個象限，觀察待測鼠於各象限所停留之時間做為記憶保存之指標。最後使用重複量數雙因子變異數分析 (repeated measure two-way ANOVA)來比較突變鼠與正常鼠之差異，並使用 Bonferroni post-hoc test 進行事後檢定。

第四節 藥物之治療效果

一、甲基安非他命(methamphetamine)

甲基安非他命為 ADHD 之藥物主成分。待測鼠將隨機分派至 0.05, 0.1, 2 mg/kg 之劑量，實驗一開始，先以皮下注射方式(subcutaneous injection, s.c.)施打生理食鹽水，並於注射後三十分鐘(Veh-30)觀察待測鼠在敞箱實驗中的運動能力，並於兩小時後施打不同劑量之甲基安非他命，觀察在注射後三十分鐘(Meth-30)、一天(Day1) 與三天(Day3) 待測鼠在敞箱實驗的行為表現。本實驗之流程如圖十四 A 所示。實驗結果使用 Prism 統計軟體中的單因子與雙因子變異數分析(repeated measure one-way or two-way ANOVA)進行統計分析，並使用 Bonferroni post-hoc test 進行事後檢定。

二、利他能(Ritalin)

1. 利他能劑量之篩選

利他能為目前 ADHD 臨床第一線臨床用藥，主成分為派醋甲酯(methylphenidate)，在藥理分類上屬於中樞神經興奮劑。根據先前使用利他能改善 ADHD 動物模式過動行為之相關研究(Gainetdinov et al., 1999; Rhodes & Garland Jr, 2003; Avale et al., 2004)，我們選擇檢測 1, 10, 20, 25, 30 mg/kg 之藥效，Ritalin 的半衰期為 1 至 2 小時，藥效約可維持 3 至 4 小時，因此在皮下注射不同劑量的利他能 30 分鐘後(Ritalin-30)，觀察待測鼠在敞箱實驗中的運動能力。並從上述不同的劑量之藥效反應篩選出無效與有效劑量。由於本實驗使用之利他能非純物質(pure compound)，因此選擇一個低劑量但不改變待測鼠行為之無效劑量作為控制組；而有效劑量與先前研究結果相符可改善過動之症狀。為了探討無效與有效劑量之長時間藥物效果，待測鼠於皮下注射後進行兩小時之敞箱實驗，並以十分鐘為一單位，計算在每單位的總移動距離。

2. 利他能之治療效果

本實驗將檢測利他能在過動、語言溝通障礙及刻板行為之改善效果。實驗開始時首先注射食鹽水，在 30 注射後 30 分鐘(Veh-30)時進行敞箱實驗，並於兩小時後注射利他能 1 或 30 mg/kg，在注射後 30 分鐘(Ritalin-30)，再次進行敞箱實驗，觀察利他能對於運動能力之影響。隔天在實驗前五至六小時，單獨隔離每隻待測鼠並更換新

的墊料，實驗程序與上述雷同，實驗開始時首先注射食鹽水，在注射後 30 分鐘(Veh-30)時錄影 5 分鐘紀錄小鼠的刻板行為，於兩小時後注射利他能 1 或 30 mg/kg，同樣於注射後 30 分鐘(Ritalin-30)，先錄影 5 分鐘紀錄小鼠的刻板行為，接著進行母鼠誘發之成鼠超音波鳴叫之記錄，並於一小時後收取腦組織(方法見下述”腦組織採集”)。各行為實驗之分析同上述小鼠之行為測試，唯使用 Prism 統計軟體中的單因子與雙因子變異數分析(repeated measure one-way or two-way ANOVA)進行統計分析，並使用 Bonferroni post-hoc test 進行事後檢定。

第五節 多巴胺含量之分析

一、腦組織採集

行為結束後的 *Cdkl5* 突變小鼠及同胎野生型公鼠以斷頸(cervical dislocation)方式犧牲後，直接取出全腦組織，並以 1X PBS 浸泡洗淨殘餘血液，將全腦組織放置冰台上，以切割棒切除嗅球與小腦。將腦組織平放在腦切片組(brain matrix)上，以刀片切割成均等厚度(1mm)的九片冠狀切片，依照圖譜的解剖位置，以切割棒從前至後端，依序取出前額皮質(medial prefrontal cortex, mPFC)、阿控伯氏核(nucleus accumbens, NAc)、海馬迴(hippocampus)、中腦腹側區(ventral midbrain, VMB)、小腦(cerebellum, Cbl); 另外使用 puncher 依序取出前端紋狀體(rostral striatum, ST-r)與相對應之前端皮質(rostral cortex, CTX-r)、中端紋狀體(middle striatum, ST-m)與相對應之皮質(middle cortex, CTX-m)及後端紋狀體(caudal striatum, ST-c)與相對應之皮質(caudal cortex, CTX-c)。上述處理步驟均於冰上進行，組織取下後經急速冷凍，置於-80℃冷凍櫃中儲存。

二、高效液相層析術(High-performance liquid chromatography, HPLC)

本實驗所使用 HPLC 系統包含電化學偵測器(VT-03 electrochemical flow cell)、自動注入裝置(S5200 Autosampler)、高壓幫浦(S1122 HPLC pump)及 C18 管柱(Sykam Corp)。層析管柱加熱器溫度設定在 30℃ 下進行分析，幫浦流速設定 0.8 ml/min，碳電極設定為 0.51V，參考電極為 Ag/AgCl，實驗注入的樣本量為 20 µl。

所使用的流動相(mobile phase)包含 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.74 mM heptane-1-sulfonic acid sodium salt, 0.027 mM EDTA, 2 mM KCl and 10% methanol; 使用 phosphoric acid 調整 pH = 3.0) 並使用 0.22 μm 濾紙過濾(Critical, Inc)且除氣 60 分鐘。在分析樣本前會先以 30% 甲醇沖洗管柱和樣品注射器半小時，待機器穩定後，則開始進行分析。分析樣本加入 210 μl 的 0.1N 過氯酸在醋酸標準液與 0.45mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ，使腦組織軟化後，放在冰上於低溫環境下使用超音波振盪將組織均質化震碎，接著以 14,000g 4°C 離心十分鐘，以分離細胞雜質，取上清液且使用 0.22 μm nylon filters (Millipore)過濾後才進行 HPLC 檢測。本實驗主要分析多巴胺及其代謝物 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 和 homovanillic acid (HVA)，參考樣本 (standard) 為以三種濃度 (500, 100, 20 ng/ml) 配置之上述三種標準物(Sigma, USA)。

三、HPLC 之定量方法

HPLC 之測量結果使用分析軟體 Clarity (DataApex)進行定量，所有數據之信噪比 (signal-to-noise ratio) 需大於 3 才列入後續分析。其定量出的數值，將同胎野生型小鼠除以基因剔除小鼠所得百分比(% of WT)，以 Student's *t* test 進行不同基因型之比較。

第六節 蛋白質表現之分析

一、蛋白質定量

將腦組織加入含有蛋白酶抑制劑(protease inhibitor, Amresco)的 lysis buffer，使腦組織軟化後，置於冰上使用超音波振盪將組織均質化，接著以 14,000g, 4°C 離心 10 分鐘，以分離細胞雜質，取上清液進行蛋白質濃度測定。蛋白質濃度測定之程序如下：於 799 μl 的去離子水及 200 μl protein assay dye(Bio-Rad)中加入 1 μl 的蛋白質溶液，混合均勻後，利用分光光度計測量蛋白質樣本之濃度。

二、西方點墨法(Western blotting)

使用 lysis buffer 將蛋白質濃度調整至 20 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 後，加入 loading dye 於 95°C 加

熱 10 分鐘，使蛋白質二級結構鬆散，接著放在冰上至少 3 分鐘，防止蛋白質重新形成二級結構，並將蒸發的液體離心下來。將製備好的蛋白質溶液等體積注入 SDS-PAGE 膠片上層的 stacking gel 中，使用 Tank buffer 做為緩衝溶液 (50mM Tris, 380mM glycine, 0.1% SDS)，以 70 伏特電壓進行電泳約 40 分鐘，待通過上層膠後，以 150 伏特電壓進行下層 separating gel 電泳約 90 分鐘。電泳進行完成後，將 SDS-PAGE 膠片取出泡在 Transfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine, 10% methanol) 中，以 75rpm 搖晃 10 分鐘，同時製備 PVDF 轉漬膜 (Milipore, USA)。首先將 PVDF 轉漬膜浸泡在 methanol 大約 30 秒，放入去離子水清洗後，再放入 transfer buffer 中。以三明治法使 PVDF 膜與 SDS-PAGE 膠片緊密貼合後，將 PVDF 膜面朝正極處，SDS-PAGE 膠片面朝負極處，以濕轉漬槽在 100 伏特電壓下進行轉漬約一小時。轉漬完成後，將含有蛋白質的 PVDF 膜剪裁合適大小，以 6% 脫脂奶粉 (以 0.05% TBST 配製) 於室溫下進行 blocking 一小時，完畢後即可加入初級抗體 (詳見表二)，利用 3D 搖晃器於 4°C 冰箱中反應至少 16 小時。

第二天使用 0.1% TBST (25mM Tris, 150mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% Tween20, pH=8.0) 溶液清洗三次除去殘餘的初級抗體，接著加入二級抗體，於室溫下反應一小時。所使用之二級抗體包括 HRP conjugated goat anti-rabbit、HRP conjugated goat anti-mouse、HRP conjugated goat anti-guinea pig、HRP conjugated donkey anti-goat 以及 HRP conjugated goat anti-rat (1:10000, Jackson Immuno Research)。二級抗體反應完後再以 0.1% TBST 清洗三次，最後加入冷光呈色試劑 (enhanced chemiluminescence, ECL, Milipore) 呈色，並以電泳膠影像系統 (LIAS Operating Instructions) 擷取影像。挑選適合的影像利 Image J 軟體進行定量分析。

三、蛋白質表現之定量方法

利用 Image J 影像分析軟體，圈選電泳膠影像系統所擷取的影像，定量蛋白質的強度，將由軟體分析出的強度波形，以整個波形的上三分之一處沿切線畫記，藉此排除背景訊號，最後計算剩餘之面積，所得值即為目標蛋白質強度，最後計算目標蛋白質相對

於 GAPDH 的倍數，並除以同胎野生型公鼠(% of WT)，所得之比值使用 Student' s t test 進行統計分析，比較突變鼠與正常鼠之差異。



表二：本實驗所使用之初級抗體

初級抗體	宿主	濃度	廠商
cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)	Rabbit	1:300	abcam
p-Ser ⁴⁰ tyrosine hydroxylase(p-TH ⁴⁰)	Rabbit	1:2000	Symansis
tyrosine hydroxylase (TH)	Rabbit	1:20000	Millipore
monoamine oxidase A (MAOA)	Rabbit	1:5000	abcam
monoamine oxidase B (MAOB)	Goat	1:500	Santa Cruz Biotechnology
catechol-O-methyltransferase (COMT)	Mouse	1:5000	BD Biosciences
dopamine transporter (DAT1)	Rat	1:500	Millipore
dopamine D2 receptor (DRD2)	Rabbit	1:1000	Millipore
dopamine D4 receptor (DRD4)	Rabbit	1:500	abcam
neuroligin 1(NL1)	Rabbit	1:1000	Synaptic Systems
neuroligin 2 (NL2)	Rabbit	1:1000	Synaptic Systems
vesicular monoamine transporter 2 (vMAT2)	Rabbit	1:500	Millipore
glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67,GAD1)	Mouse	1:2000	Sigma
glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65,GAD2)	Rabbit	1:2000	Cell Signaling Technology
DOPA decarboxylase (DDC)	Rabbit	1:5000	abcam
postsynaptic density protein 95 (PSD95)	Mouse	1:2000	Affinity BioReagents
forkhead box protein P2 (FoxP2)	Rabbit	1:1000	abcam
vesicular glutamate transporter 2 (vGluT2)	Guinea Pig	1:20000	Synaptic Systems
vesicular GABA transporter (VGAT)	Mouse	1:500	Synaptic Systems
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Mouse	1:100000	Millipore

第三章 結果

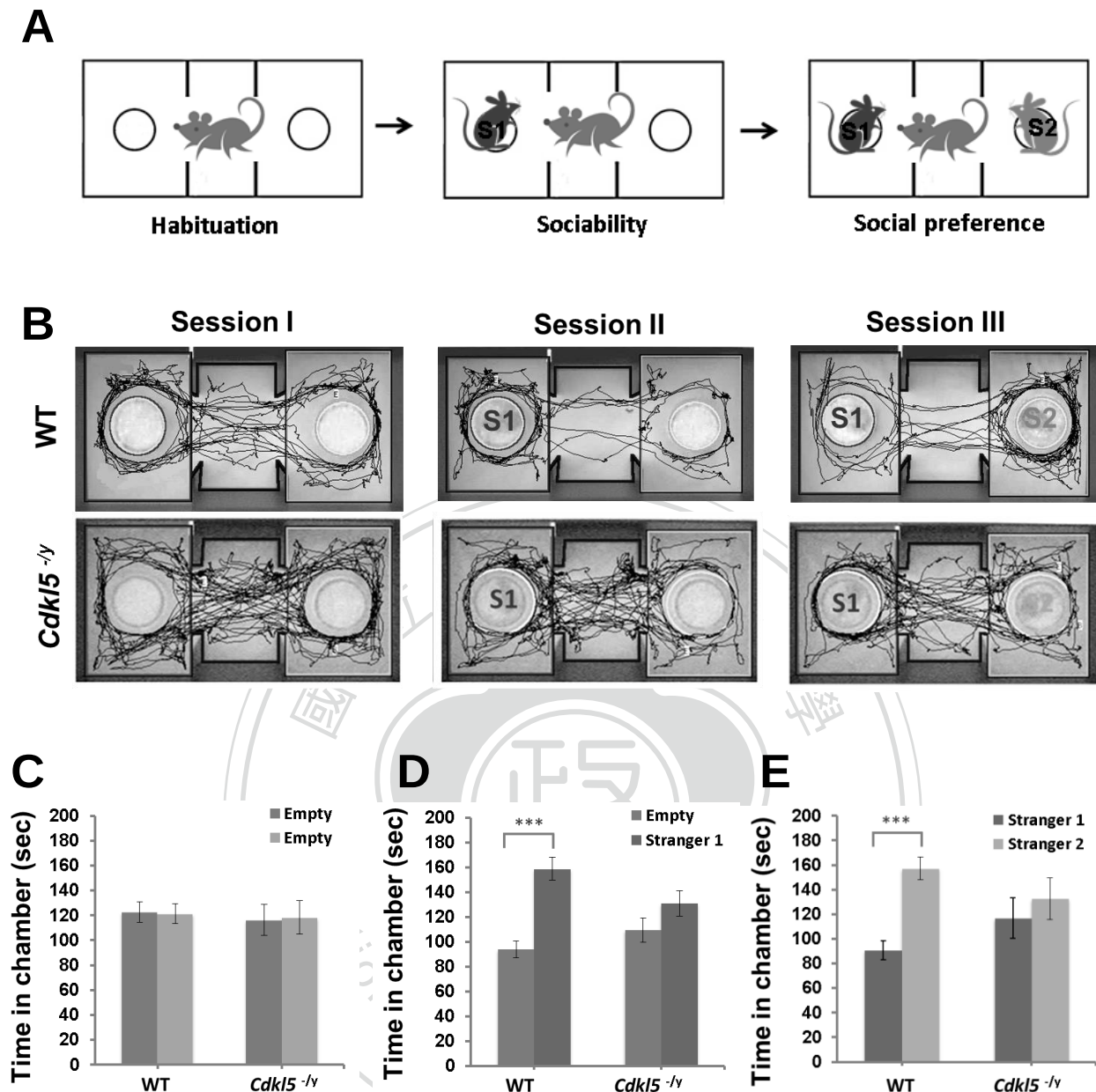
第一節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現類似 ASD 三大核心症狀之異常行為

本研究所使用的 *Cdkl5* 基因剔除小鼠，經由免疫漬墨的方法驗證，確實於全腦缺少 CDKL5 蛋白的表現(附錄二)。由於 *Cdkl5* 相關之疾病主要以 ASD 為主，因此我們首先檢測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否具有 ASD 之核心症狀，目前臨床上三大診斷標準分別為：(1) 社交障礙、(2) 溝通障礙和 (3) 重複且無目的的刻板行為，因此我們在約一個月大之雄性成鼠檢測上述之行為能力。首先，以社會互動與新奇事物探索之實驗 (three chamber social preference test) 比較 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, *n* = 14) 與野生型小鼠 (Wild-type, WT, *n* = 19) 的社交能力(sociability) 與社交偏好 (social preference)，實驗程序如圖一 A 所示。在實驗第一階段 (Session I)，實驗箱的兩端皆無物體時，無論是 *Cdkl5* 突變或野生型小鼠皆無明顯偏好，在兩端所停留的時間並無顯著差異 (122.70 ± 8.19 vs 121.42 ± 7.83 in WT, $p > 0.05$; 116.25 ± 12.47 vs 118.42 ± 13.62 in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$, Student's *t*-test; 圖一 C)。在實驗第二階段 (Session II)，測試小鼠的社交能力，隨機選擇一端放入一隻年齡相仿的野生型公鼠(Stranger 1, S1)，發現野生型小鼠顯著地花較多時間停留在有 S1 的區域 (Empty: 93.9 ± 6.9 vs S1: 158.7 ± 9.2 , $p < 0.001$, Student's *t*-test; 圖一 D)；而 *Cdkl5* 基因剔除公鼠則無明顯偏好 (Empty: 109.5 ± 9.8 vs S1: 130.8 ± 10.0 , $p > 0.05$, Student's *t*-test; 圖一 D)，表示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在社交能力上有明顯缺失。在實驗第三階段 (Session III)，測試小鼠的社交偏好，於 S1 所在的另一側再放入一隻新的年齡相仿的野生型公鼠(Stranger 2, S2)，發現野生型小鼠顯著地停留較多時間在有 S2 的區域，顯示其具有辨識新舊同類的能力 (S1: 90.66 ± 7.75 vs S2: 157.32 ± 9.09 , $p < 0.001$, Student's *t*-test; 圖一 E)；而 *Cdkl5* 基因剔除小鼠卻仍無明顯偏好 (S1: 116.85 ± 16.52 vs S2: 132.70 ± 16.91 , $p > 0.05$, Student's *t*-test; 圖一 E)。由上述實驗結果可得知，*Cdkl5* 基因剔除小鼠無論是在社交能力或是社交偏好上，均較野生型小鼠明顯不足。

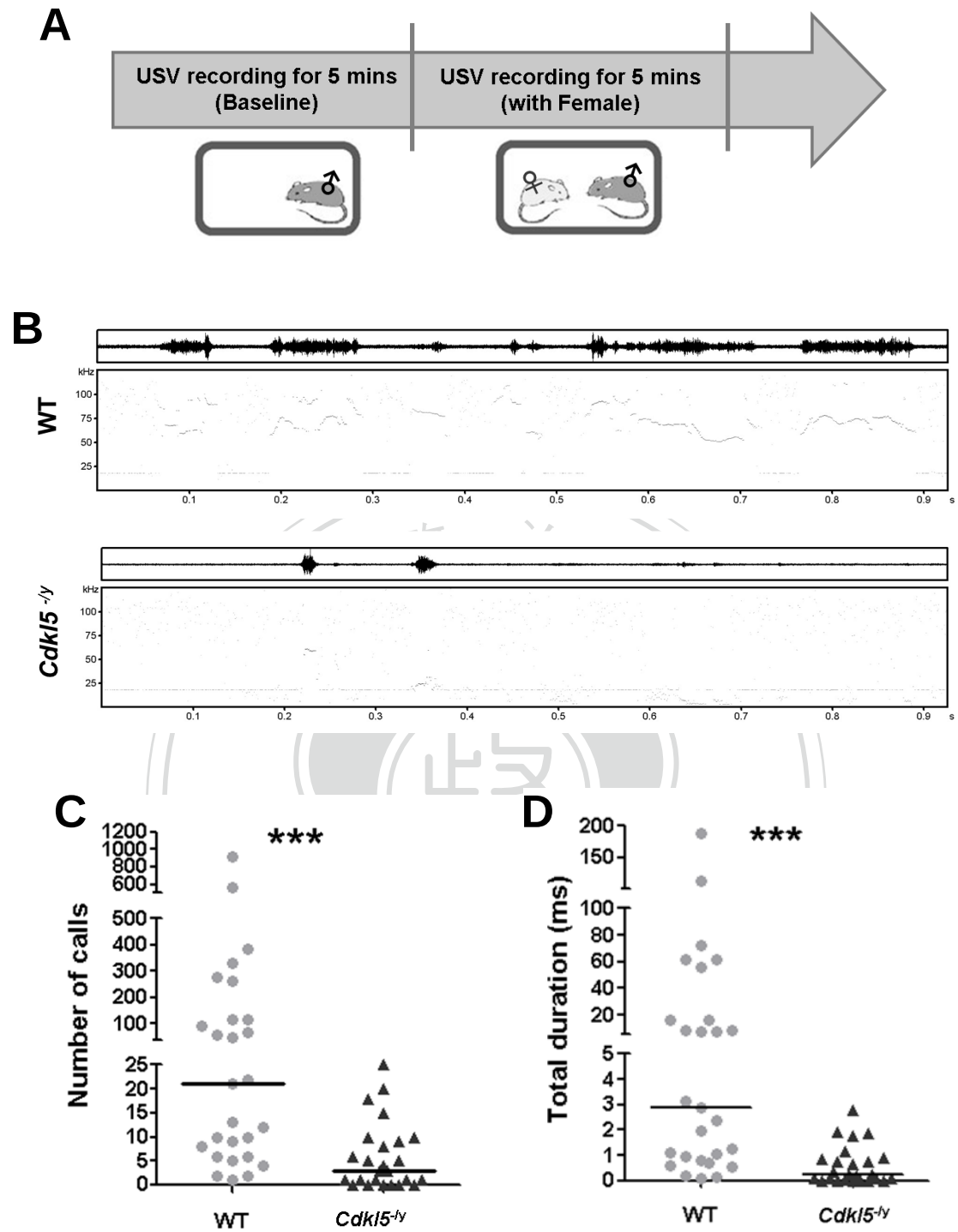
由於先前研究並未探討除了社交障礙以外的自閉症狀(Wang et al., 2012)，因此接下來我們將詳細分析 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否表現類似 ASD 另外兩大核心症狀之行

為。我們使用母鼠誘發之成鼠超音波實驗(female-induced ultrasonic vocalization)檢測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在社交溝通上是否具有正常能力。為了避免生殖行為的干擾，本實驗所使用誘發叫聲之母鼠年紀均小於四十五天尚未性成熟且未發情。在放入母鼠後，*Cdkl5* 基因剔除小鼠 ($n = 25$) 相較於野生型小鼠 ($n = 27$) 在五分鐘的測試時間內發出較少次數的超音波鳴叫聲 (number of calls) (WT: 124.96 ± 14.24 vs *Cdkl5*^{-/-}: 5.84 ± 1.36 , $p < 0.001$; Mann-Whitney U test; 圖二 C); 總鳴叫時間(total duration) 也顯著的少於野生型小鼠 (WT: 23.50 ± 2.92 vs *Cdkl5*^{-/-}: 0.59 ± 0.15 , $p < 0.001$; Mann-Whitney U test; 圖二 D)。由上述實驗可得知，*Cdkl5* 基因剔除小鼠相較於正常鼠具有較差之社交溝通能力。

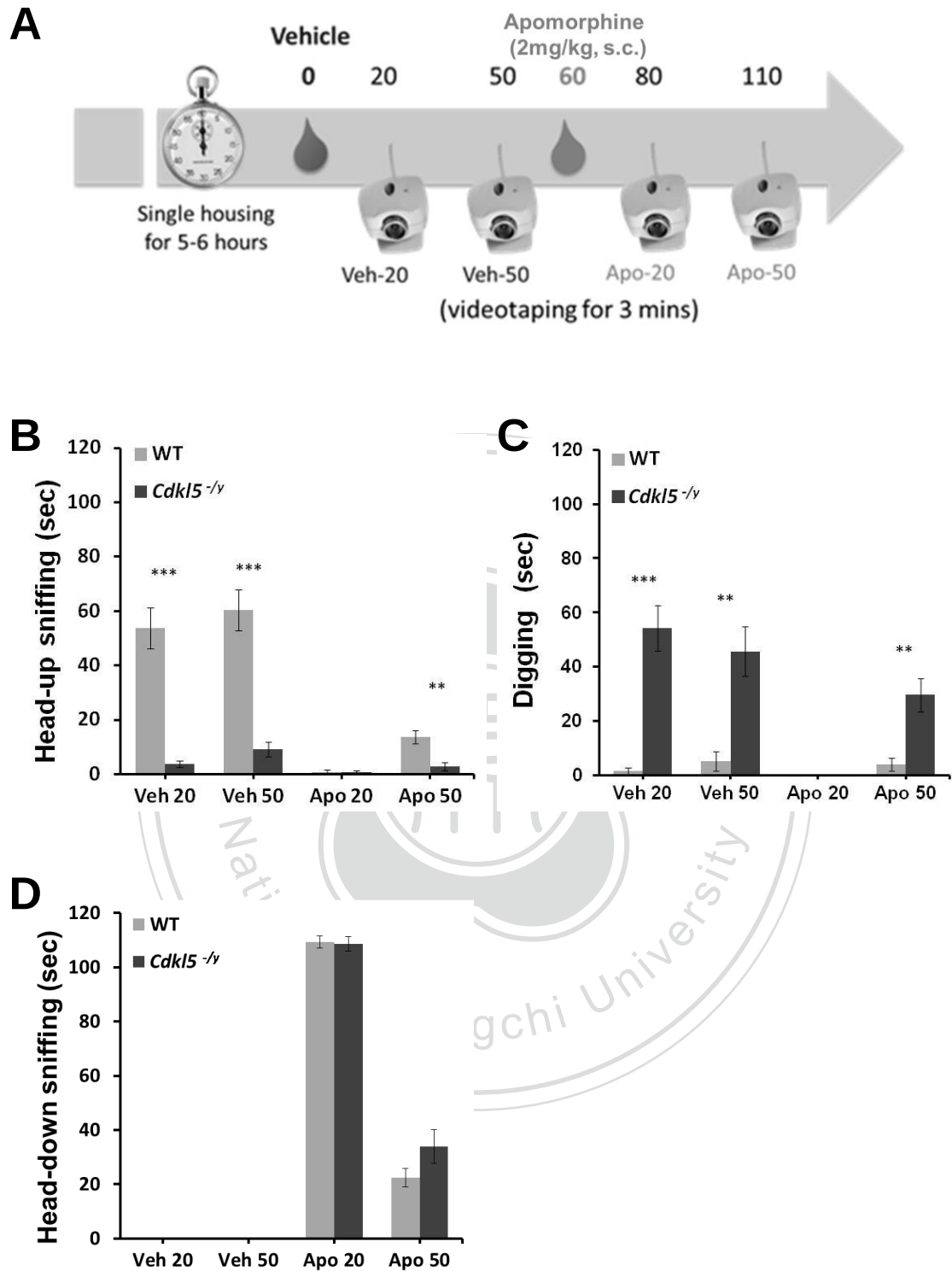
最後，我們使用皮下注射 apomorphine 藥物來誘發刻板行為(Liao et al., 2008)，實驗流程如圖三 A 所示。值得注意的是，我們發現在注射生理食鹽水後的二十 (Veh20)、五十 (Veh50)分鐘及打藥後的五十 (Apo50) 分鐘，野生型小鼠($n = 6$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠($n = 11$) 分別有不同的行為表現，野生型小鼠表現出較多抬頭嗅聞(head-up sniffing)的行為 (Veh20: 53.833 ± 7.51 in WT vs 3.727 ± 1.18 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Veh50: 60.333 ± 7.61 in WT vs 9.182 ± 2.79 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Apo50: 13.667 ± 2.54 in WT vs 2.909 ± 1.50 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.01$; repeated measure two-way ANOVA, 圖三 B)，但 *Cdkl5* 基因剔除小鼠卻花較多的時間在挖掘墊料(digging) (Veh20: 1.50 ± 1.15 in WT vs 54.18 ± 8.32 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Veh50: 5.17 ± 3.49 in WT vs 45.64 ± 9.08 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.01$; Apo50: 3.83 ± 2.43 in WT vs 29.55 ± 6.08 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.01$; repeated measure two-way ANOVA; 圖三 C)，而在注射 apomorphine 後二十分鐘(Apo20)與五十分鐘(Apo50)，因藥效所產生的”低頭嗅聞”(head-down sniffing) 之刻板行為，在野生型小鼠或 *Cdkl5* 基因剔除小鼠間並無明顯差異(Apo20: 109.333 ± 2.16 in WT vs 108.636 ± 2.64 in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; Apo50: 22.5 ± 3.35 in WT vs 33.909 ± 6.21 in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; repeated measure two-way ANOVA; 圖三 D)，顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在無任何藥物處理的情況下，自發性的表現出較多重複且不具功能性的動作。



圖一、*Cdkl5* 基因剔除小鼠表現出較差的社會互動能力。(A) 社會互動與社交偏好之實驗流程圖。(B) 分別為野生型小鼠(上排, WT, $n = 19$)與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠(下排, *Cdkl5*^{-/-}, $n = 14$)在各實驗階段之移動軌跡圖。(C-E) 分別為實驗三階段於各區間所停留時間之柱狀圖。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。



圖二、*Cdkl5* 基因剔除小鼠在社交溝通的表現有明顯缺失。(A) 母鼠誘發之成鼠超音波鳴叫實驗流程圖。(B) 野生型小鼠 (WT, $n = 27$; 上排)與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5^{-/-}*, $n = 25$; 下排)叫聲頻率代表圖。X 軸為時間 (單位: 秒); Y 軸為頻率 (單位: 千赫茲)。(C) 超音波鳴叫次數之散布圖。(D) 超音波總鳴叫時間之散布圖 (單位: 毫秒)。圖中黑色實線代表中位數(median)。***, $p < 0.001$, Mann-Whitney U test。



圖三、*Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較多挖掘墊料之刻板行為。(A) Apomorphine 誘發刻板行為實驗流程圖，3 分鐘錄影片段之後 2 分鐘用於行為分析。s.c. 皮下注射。(B) 各觀察時間點野生型小鼠 (WT, $n = 6$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, $n = 11$) 表現抬頭嗅聞的總時間。(C) 各觀察時間點待測鼠表現挖掘墊料的總時間。(D) 各觀察時間點待測鼠表現低頭嗅聞的總時間。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, repeated measure two-way ANOVA。

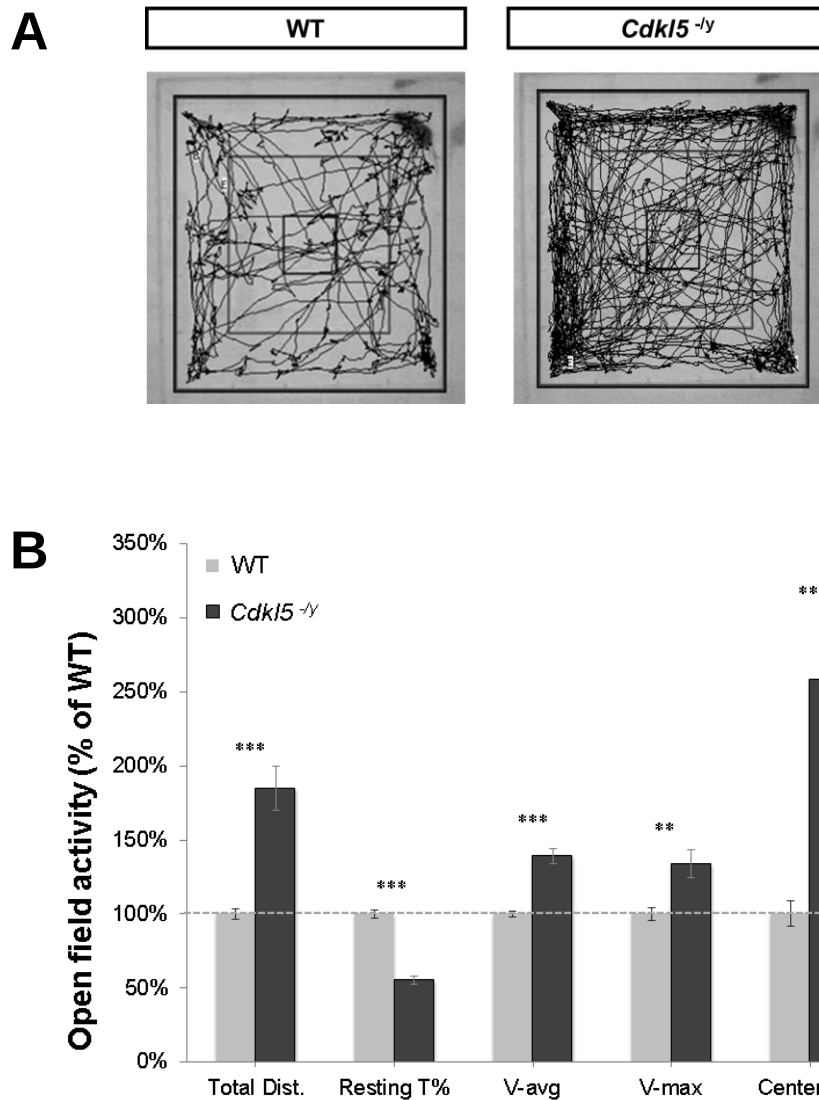
第二節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現過動、衝動與學習障礙

先前研究指出接近三分之一的 ASD 兒童會與 ADHD 共病(Rao & Landa, 2013)，而 ADHD 目前在臨床診斷的三大標準如下：(1) 活動量過多 (hyperactivity)、(2) 衝動 (impulsivity)和 (3) 注意力不易集中 (inattention) (Applegate et al., 1997)。當我們以敞箱實驗比較 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 ($n = 9$) 與同胎野生型公鼠 ($n = 11$) 的運動能力 (圖四 A) 時，發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在總移動距離 (total traveled distance, Total Dist: 184.7 ± 14.8 % of WT, $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖四 B)、平均速度 (average speed, V-avg: 139.1 ± 4.9 % of WT, $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖四 B) 與最大移動速度 (maximal speed, V-max: 133.8 ± 9.3 % of WT, $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖四 B) 皆有明顯增加，且停止不動的時間百分比(% of immobility time, Resting T%: 55.1 ± 3.0 % of WT, $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖四 B) 也相對減少，顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現出過動之症狀。

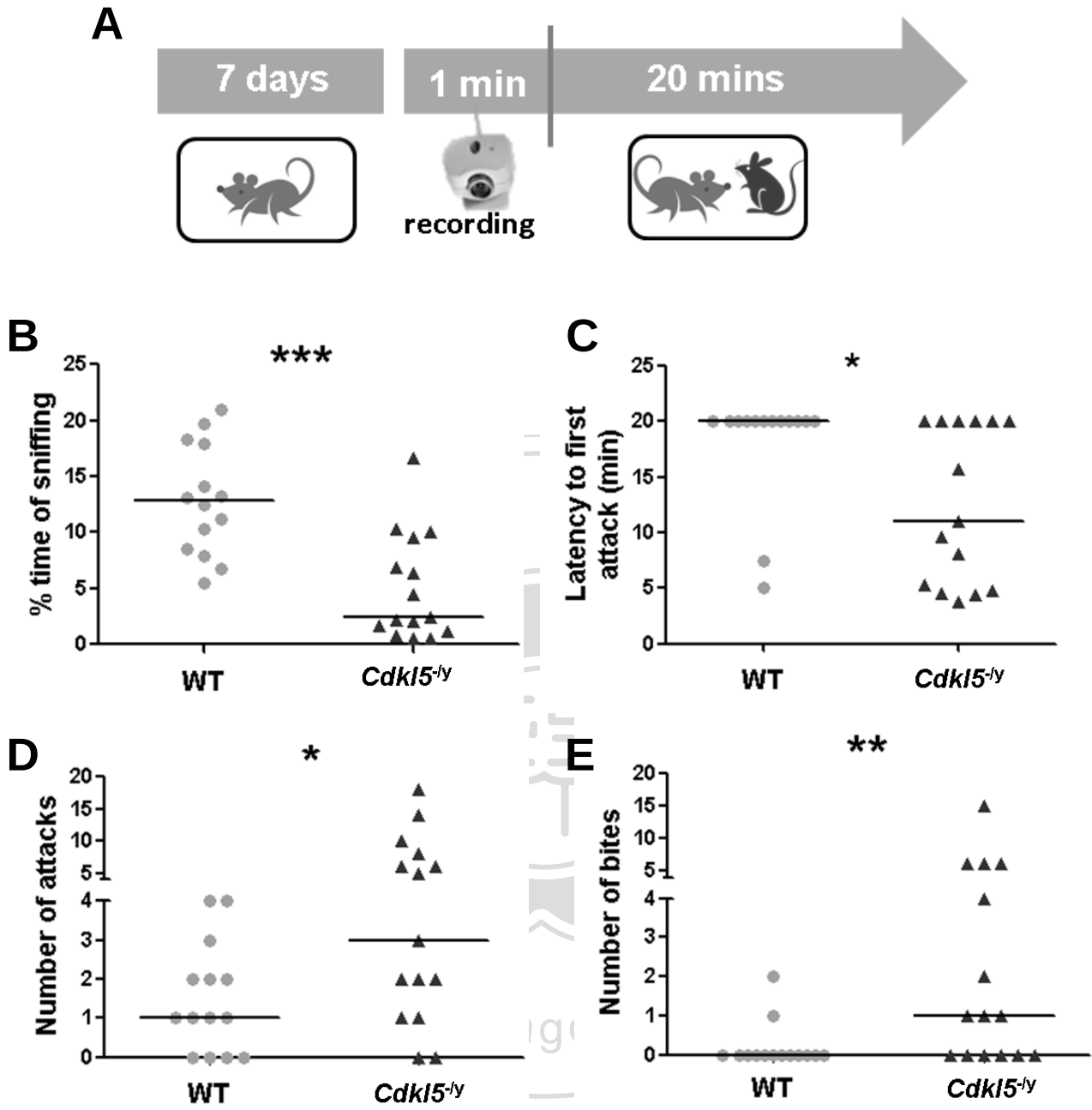
由於衝動行為與相關之疾病常發生於社會互動的情境之下，因此許多動物研究常以攻擊行為 (aggressive behavior) 來代表衝動抑制能力之指標 (Botchin et al., 1993; Kaplan et al., 1995; Higley et al., 1998)。為了進一步探討 *Cdkl5* 突變小鼠是否具有其他注意力不足過動症之症狀，我們利用居留者-入侵者測試 (resident-Intruder test) 來檢驗 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否較具衝動性與(impulsivity)攻擊性(aggressiveness) (圖五 A)。正常 C57/B6 野生型公鼠當遇到外來入侵者時，會主動嗅聞入侵者尾部，但我們發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠卻顯著地減少此行為之表現 (% time of sniffing: 13.30 ± 1.27 % in WT vs 4.73 ± 1.04 % in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Mann-Whitney U test; 圖五 B)，這部分與先前實驗中發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有社交能力障礙相呼應(圖一)。雖然表現較少的互動行為，但 *Cdkl5* 基因剔除小鼠卻較快採取第一次主動攻擊行為 (latency to first attack: 18.04 ± 1.34 in WT vs 12.48 ± 1.82 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$; Mann-Whitney U test; 圖五 C)，且具有較高頻率的攻擊行動(number of attacks: 1.5 ± 0.37 in WT vs 5.2 ± 1.38 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$; Mann-Whitney U test; 圖五 D) 與較多主動啃咬入侵者的行為 (number of bites: 0.21 ± 0.15 in WT vs 2.80 ± 1.07 in

Cdkl5^{-/-}, $p < 0.01$; Mann-Whitney U test; 圖五 E), 顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有較差的衝動抑制能力與較高之攻擊性。

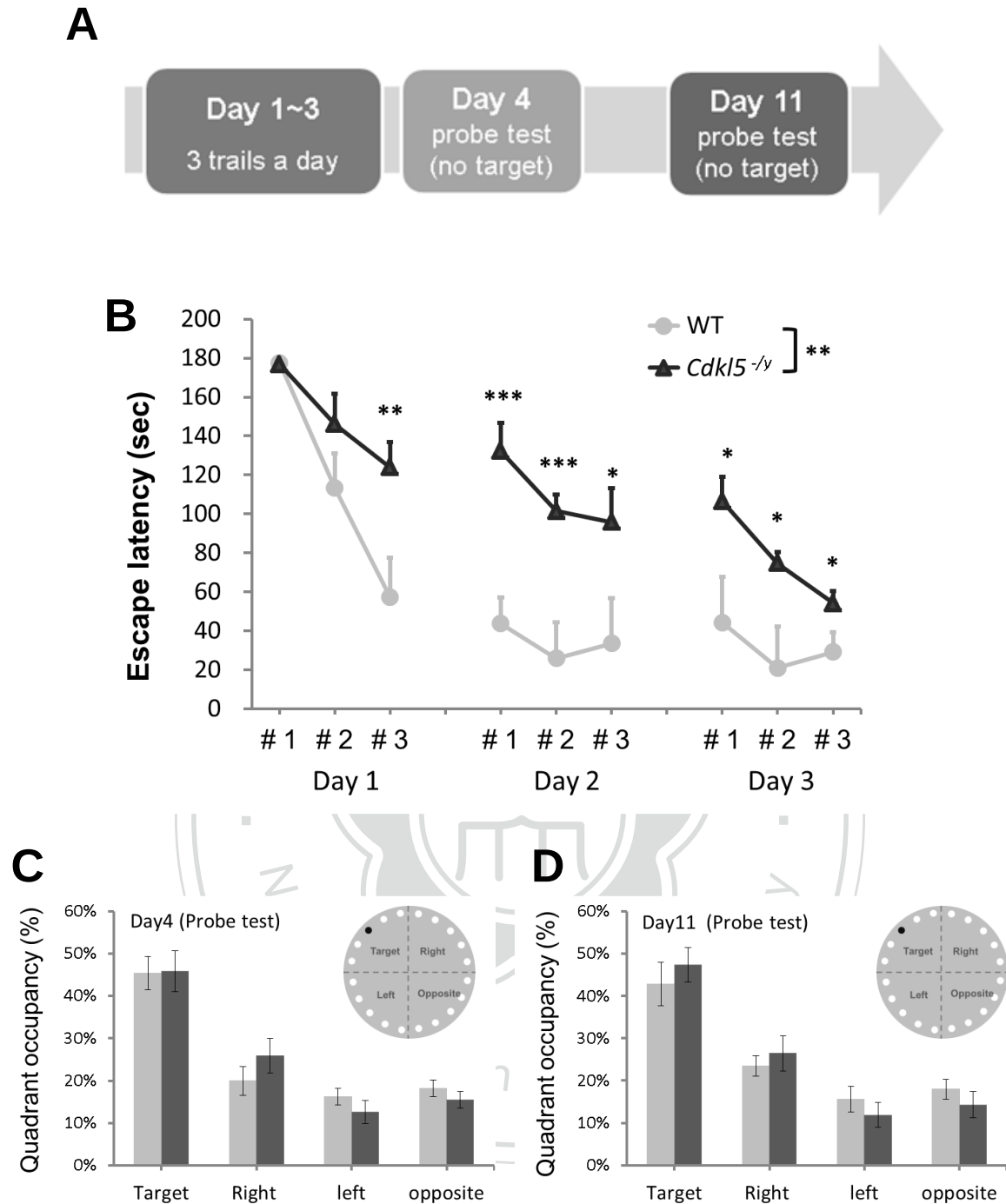
為檢測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠注意力是否有所缺失, 我們選用測量認知學習能力的巴奈氏迷宮(Barnes maze)來檢測 (Potter et al., 2005) (圖六 A)。此測驗原理與水迷津相同, 小鼠需藉由周遭環境線索學習找到躲避的地方, 但此實驗不在水中進行, 因此可以減少動物之壓力。利用此行為檢測有兩大原因, 其一為先前的研究 (Bahi-Buisson et al., 2008) 指出 CDKL5 突變的病人常伴隨著嚴重的智能障礙 (intellectual disability), 其二為注意力與認知能力是相輔相成的, 當個體在學習某認知行為時, 常伴隨著注意力的使用與轉移, 因此我們選擇用此實驗來檢測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠。我們發現在每天三次為期三天的學習過程中, *Cdkl5* 基因剔除小鼠 ($n = 9$) 花費比野生型公鼠 ($n = 9$) 較長的時間才能找到躲避區(latency to target, Day1#1: 177.6 ± 2.4 in WT vs 176.9 ± 3.1 in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; Day1#2: 113.3 ± 15.5 in WT vs 146.1 ± 17.7 in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; Day1#3: 57.2 ± 12.9 in WT vs 123.9 ± 20.4 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$. Day2#1: 43.8 ± 14.3 in WT vs 132.3 ± 13.5 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Day2#2: 25.9 ± 8.5 in WT vs 101.6 ± 18.4 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.001$; Day2#3: 33.6 ± 17.2 in WT vs 95.9 ± 23.4 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$. Day3#1: 44.4 ± 12.6 in WT vs 106.7 ± 23.3 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$; Day3#2: 21.1 ± 5.6 in WT vs 74.7 ± 21.0 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$; Day3#3: 29.2 ± 6.2 in WT vs 54.2 ± 10.0 in *Cdkl5*^{-/-}, $p < 0.05$; $F_{(1,16)}=18.73$, $p < 0.001$, repeated measure two-way ANOVA; 圖六 B)。在實驗開始的第四天與第十一天移除躲避區進行探針試驗 (probe test), 觀察小鼠在各象限停留的時間做為短期與長期記憶之指標。結果顯示, 無論短期或是長期記憶, *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型公鼠並無顯著差異, 兩者皆顯著花較多時間待在原本有躲避區的象限(Day4, % time in target quadrant: $56.4 \pm 3.8\%$ in WT vs $45.9 \pm 4.8\%$ in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; Day11, % time in target quadrant: $42.9 \pm 5.1\%$ in WT vs $47.3 \pm 4.1\%$ in *Cdkl5*^{-/-}, $p > 0.05$; repeated measure two-way ANOVA; 圖六 C, D)。此結果顯示, *Cdkl5* 基因剔除小鼠與 ADHD 患者相似, 在認知學習能力上有所缺失, 但具有正常的短期與長期記憶。



圖四、*Cdkl5* 基因剔除小鼠表現過動之症狀。(A) 野生型小鼠 (WT, $n = 11$, 左) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, $n = 9$, 右) 於敞箱實驗之移動軌跡圖。(B) 敞箱實驗之訂量分析結果。X 軸由左而右分為別：總移動距離、靜止不動之時間百分比、平均移動速度、最大移動速度以及於實驗箱中心區所停留時間百分比。實驗結果顯示以野生型公鼠為比較基準下 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的敞箱活動力。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。



圖五、*Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較高之攻擊性及較差之衝動控制力。(A) 居留者-入侵者實驗流程圖。(B) 野生型小鼠 (WT, $n = 14$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5^{-/-}*, $n = 15$) 嗅聞入侵者之時間百分比。(C) 待測鼠採取第一次攻擊行為之延宕時間(單位:分鐘)。(D) 待測鼠表現攻擊行為之總次數。(E) 待測鼠主動啃咬入侵者之總次數。圖中黑色實線代表中位數(median)。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, Mann-Whitney U test。



圖六、*Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較差之空間學習能力，但具有正常的短期與長期記憶。(A) 巴奈氏迷宮流程圖。(B) 野生型小鼠 (WT, $n = 9$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5^{-/-}*, $n = 9$) 於巴奈氏迷宮之學習曲線。X 軸為連續三天每天三次之嘗試；Y 軸為進入躲避區之延宕時間。(C) 待測鼠於訓練後隔天之短期記憶表現。(D) 待測鼠於訓練後一週之長期記憶表現。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, repeated measure two-way ANOVA。

第三節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺含量有所改變

先前研究指出多巴胺系統參與運動控制 (Dunnett & Lelos, 2010)、社會互動 (Burgdorf & Panksepp, 2006)、語言能力 (Dastur *et al.*, 1999) 以及攻擊行為 (Harrison *et al.*, 1997) 的運作，我們因此推測 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動、缺乏社交及溝通能力，可能和腦中多巴胺系統的異常有關聯。因此，我們接下來檢驗 *Cdkl5* 突變小鼠腦中多巴胺含量是否改變；並針對可能參與我們所觀察到的行為症狀的多巴胺神經迴路，即負責運動協調的黑質-紋狀體路徑 (nigrostriatal pathway) 與酬賞、正向情緒相關的中腦-邊緣系統路徑 (mesolimbic pathway) 進行分析 (圖七 A)。

在使用高效液相層析術 (HPLC) 分析各腦區多巴胺含量後，發現在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前額皮質 (medial prefrontal cortex, mPFC)、前端紋狀體 (rostral striatum, ST-r) 中多巴胺含量顯著的高於同胎野生型小鼠 (mPFC: 212.68 ± 18.13 % of WT, $n = 5$, $p < 0.001$; ST-r: 134.92 ± 8.53 % of WT, $n = 6$, $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖七 B); 而在後端紋狀體 (caudal striatum, ST-c) 則有顯著減少 (ST-c: 81.13 ± 8.18 % of WT, $n = 6$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖七 B)。其餘腦區如前端皮質 (rostral cortex, CTX-r) 與富含多巴胺神經元的中腦腹側區 (ventral midbrain, VMB) 則無明顯多巴胺含量的改變 (CTX-r: 113.82 ± 36.59 % of WT, $n = 3$; VMB: 97.58 ± 19.93 % of WT, $n = 10$, $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖七 B)。由上述實驗結果可知，*Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中黑質-紋狀體與中腦-邊緣系統兩條神經迴路之末梢多巴胺含量的改變，可能與其過動、缺乏社交溝通能力、攻擊性增加及認知學習障礙有所關聯。

第四節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺合成及代謝蛋白含量之表現

一、*Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺合成酶之含量有所改變

多巴胺的合成主要是由酪胺酸 (tyrosine) 經由酪胺酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 催化產生左多巴 (L-dopa)，再藉由多巴脫羧酶 (DOPA decarboxylase, DDC) 作用產生多巴胺。由於觀察到 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺含量的改變，因此我們接下來分析多巴胺合成的相關蛋白，如 TH 及其活化態——絲胺酸 40 磷酸化 TH (p-TH-Ser40,

pTH-Ser40) ，與 DDC 的表現，在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中是否有所改變。

在使用西方點墨法分析各腦區中特定蛋白的含量後發現，*Cdkl5* 基因剔除小鼠的 TH 蛋白在前額皮質與前端紋狀體表現量明顯高於同胎野生型公鼠 (mPFC: 138.33 ± 3.35 % of WT, $n = 3$, $p < 0.001$; ST-r: 155.29 ± 12.33 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖八 A, B) ，但在後端紋狀體蛋白表現則顯著減少 (57.49 ± 9.62 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test)。在中腦腹側區則無明顯改變 (112.36 ± 12.58 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; Student's *t*-test) 。

而 pTH-Ser40 蛋白表現與 TH 相似，在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前額皮質與前端紋狀體表現量明顯高於同胎野生型公鼠 (mPFC: 125.66 ± 9.42 % of WT, $n = 4$, $p < 0.05$; ST-r: 150.81 ± 13.01 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖八 A, B) ，而後端紋狀體中 p-TH⁴⁰ 蛋白含量則顯著減少 (62.28 ± 5.32 % of WT, $n = 3$, $p < 0.001$; Student's *t*-test)。在中腦腹側區並無明顯改變 (105.07 ± 18.6 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; Student's *t*-test) 。

此外，將左多巴轉變成多巴胺的多巴脫羧酶 (DDC) 的蛋白含量只在前額皮質有顯著增加 (132.7 ± 11.77 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖八 A, B) ，其餘腦區則無明顯改變 (ST-r: 88.74 ± 7.72 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; ST-c: 105.01 ± 14.47 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; VMB: 97.12 ± 10.81 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; Student's *t*-test)。綜合上述之結果可得知，*Cdkl5* 基因剔除小鼠在前額皮質與紋狀體中多巴胺含量的改變極可能是由於多巴胺合成相關蛋白表現量差異所導致。

二、*Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺代謝酶之含量有所改變

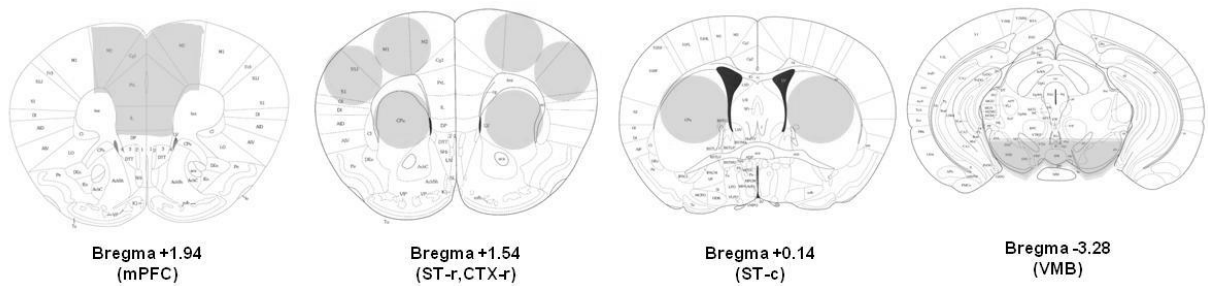
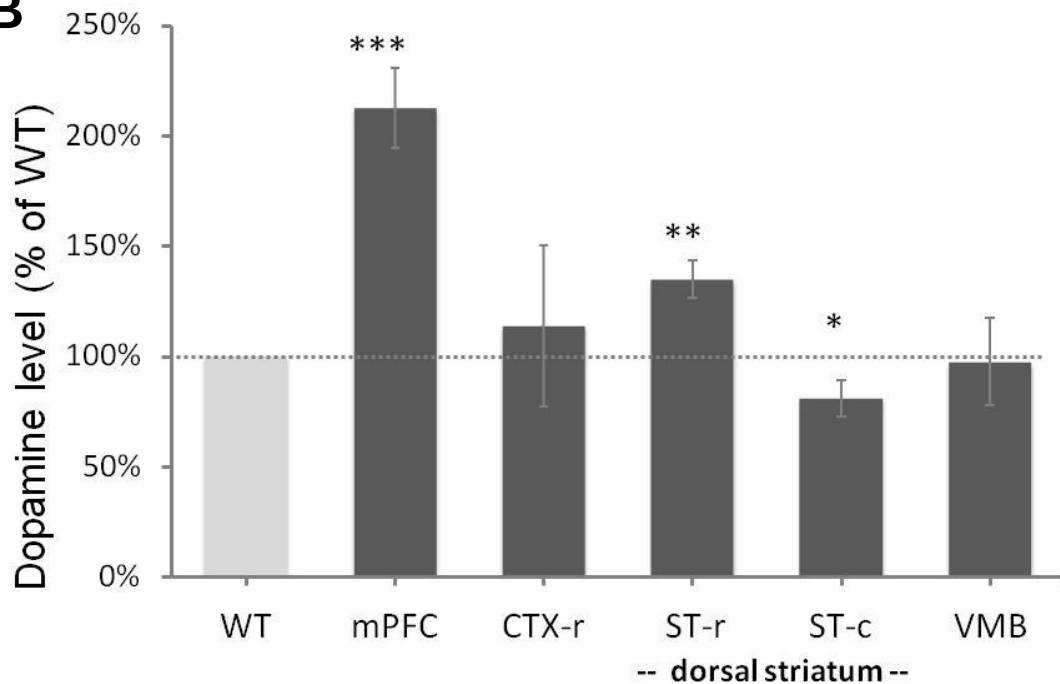
多巴胺之代謝路徑主要如下：釋放到突觸間隙的多巴胺，部分經由粒線體外膜上的單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)氧化為 3',4-二羥苯乙酸 (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)，擴散至細胞外，一部分與硫酸鹽結合排出，另一部分則經由突觸後神經元的兒茶酚氧位甲基轉移酵素(catechol-O-methyl Transferase, COMT)代謝成高香草酸(homovanillic acid , HVA)以硫酸鹽結合態或游離

態而排除。目前已知單胺氧化酶有 A 和 B 兩種亞型 (MAOA、MAOB)，A 型主要代謝血清素、正腎上腺素及腎上腺素等，A 型與 B 型則同時代謝多巴胺和胺基對乙酚 (tyramine)。由於上述實驗已觀察到 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中多巴胺含量有所改變，有可能受多巴胺代謝之影響，因此我們接下來分析多巴胺代謝酶，如 MAOA、MAOB 與 COMT，在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中的含量是否有所改變。

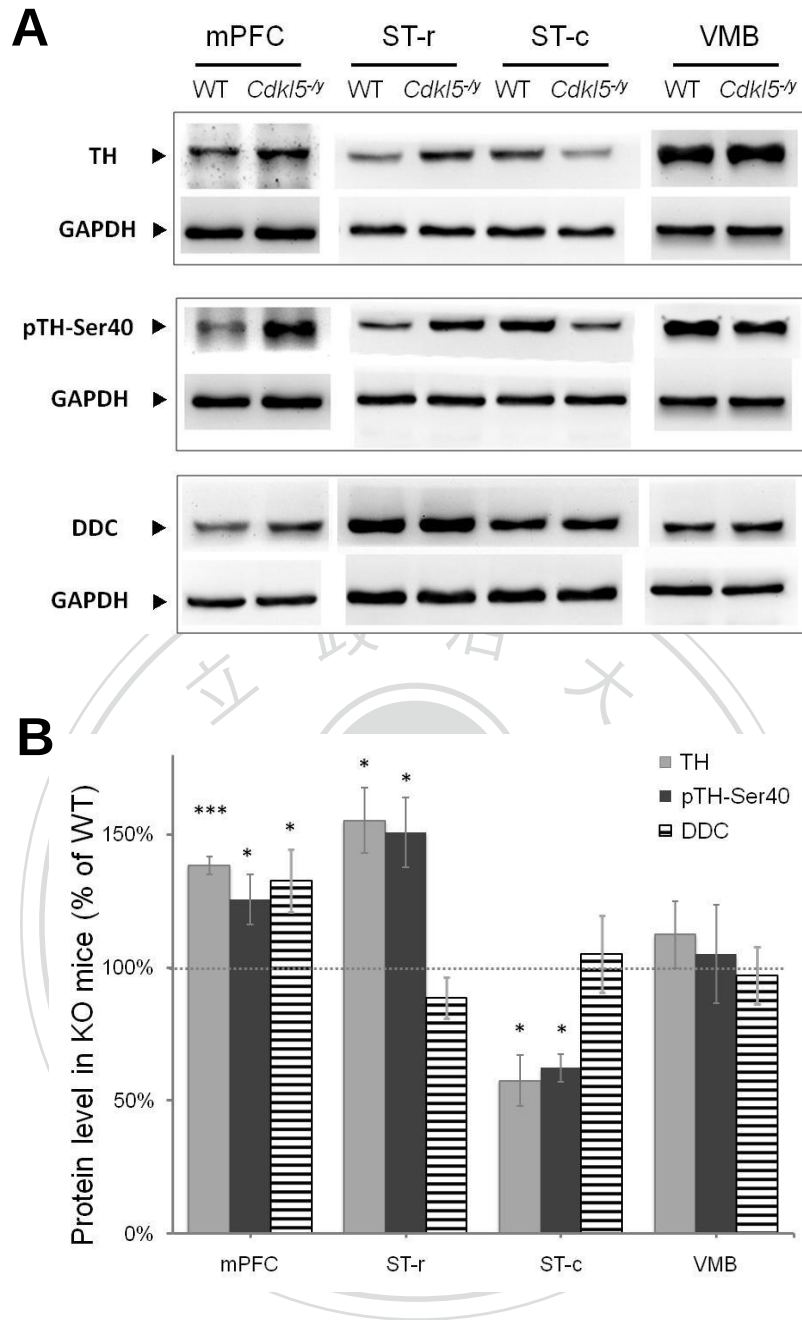
在使用西方點墨法分析各腦區特定蛋白的表現後發現，*Cdkl5* 基因剔除小鼠的 MAOA 蛋白的含量在前端紋狀體明顯低於同胎野生型公鼠 ($80.76 \pm 4.34 \% \text{ of WT}$, , $n = 4$, $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖九 A, B)，而後端紋狀體中 MAOA 蛋白表現則顯著增加 ($125.51 \pm 7.37 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p < 0.05$; Student's *t*-test)。前額皮質與中腦腹側區則無明顯改變 (mPFC: $102.33 \pm 9.12 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; VMB: $94.99 \pm 7.16 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; Student's *t*-test)。

MAOB 的含量在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前額皮質略低於同胎野生型公鼠 ($95.89 \pm 1.52 \% \text{ of WT}$, , $n = 4$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖九 A, B)，在後端紋狀體中，MAOB 蛋白表現則顯著增加 (ST-c: $117.54 \pm 2.72 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p < 0.01$; Student's *t*-test)。前端紋狀體與中腦腹側區則無明顯改變 (ST-r: $92.09 \pm 6.07 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; VMB: $111.20 \pm 9.33 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; Student's *t*-test)。

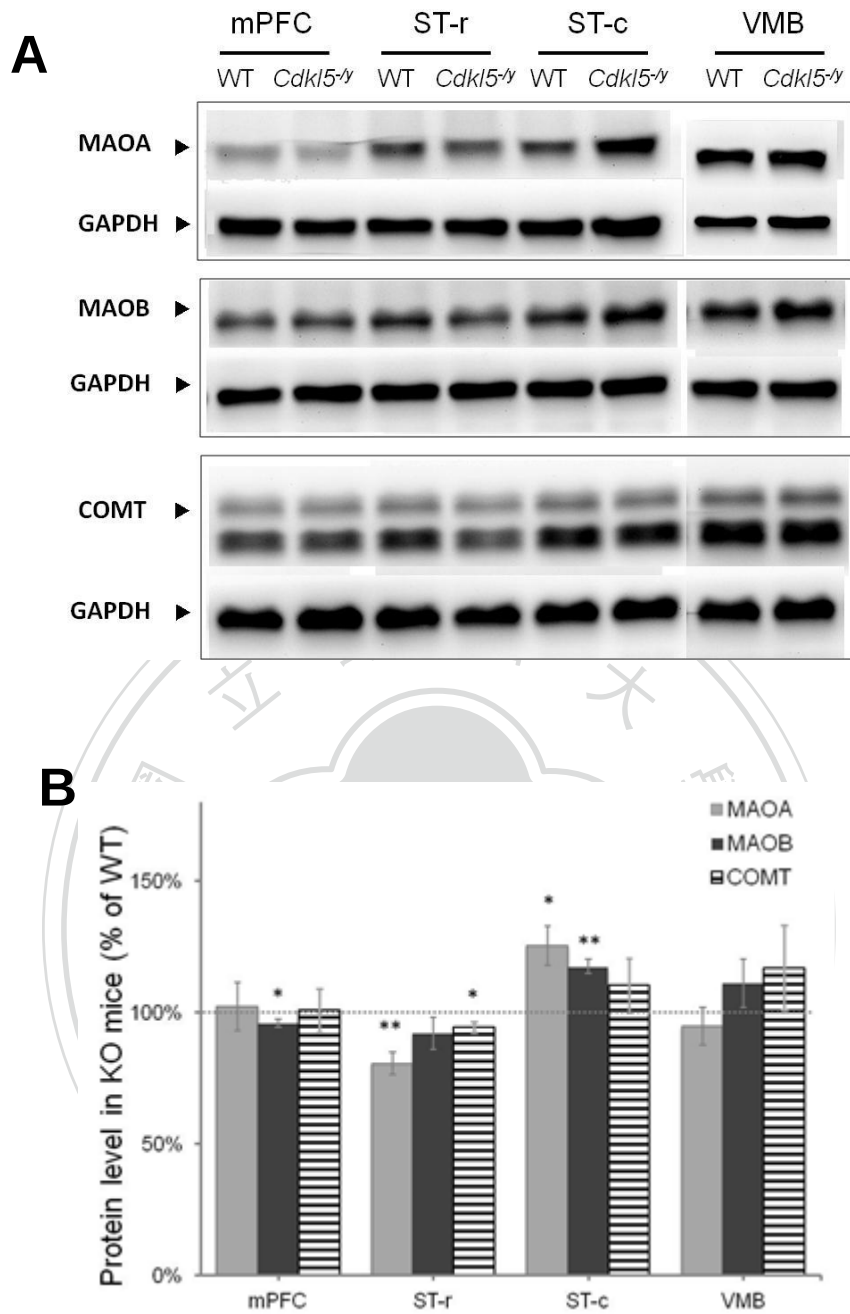
COMT 蛋白在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前端紋狀體中含量明顯低於同胎野生型公鼠 (ST-r: $94.52 \pm 2.00 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖九 A, B)，而其餘腦區則無明顯改變 (mPFC: $100.92 \pm 8.37 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; ST-c: $110.34 \pm 10.5 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; VMB: $117.11 \pm 16.23 \% \text{ of WT}$, $n = 4$, $p > 0.05$; Student's *t*-test)。綜合上述之結果可得知，*Cdkl5* 基因剔除小鼠在前額皮質與紋狀體中多巴胺含量的改變可能多巴胺代謝相關蛋白表現量差異所導致。

A**B**

圖七、*Cdk15* 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺含量有明顯改變。(A) 用於分析多巴胺含量之腦區相對位置。(B) 利用 HPLC 分析大腦各區中多巴胺含量之結果。實驗結果顯示以野生型公鼠 (WT, $n = 4 - 10$) 為比較基準下 *Cdk15* 基因剔除小鼠 (*Cdk15*^{-/-}, $n = 4 - 10$) 的各腦區中多巴胺含量。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。mPFC, 前額皮質 (medial prefrontal cortex); CTX-r, 前端皮質 (rostral cortex); ST-r, 前端紋狀體 (rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體 (caudal striatum); VMB, 中腦腹側區 (ventral midbrain)。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。



圖八、*Cdkl5* 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺合成酶之表現量。(A) 西方點墨法顯示野生型小鼠 (WT, $n = 4$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, $n = 4$) 各腦區中 tyrosine hydroxylase (TH)、p-Ser40 tyrosine hydroxylase (pTH-Ser40) 和 DOPA decarboxylase (DDC) 的蛋白質含量，GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現之定量結果。計算方式為 *Cdkl5* 基因剔除小鼠除以同胎野生型公鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。mPFC, 前額皮質 (medial prefrontal cortex); CTX-r, 前端皮質 (rostral cortex); ST-r, 前端紋狀體 (rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體 (caudal striatum); VMB, 中腦腹側區 (ventral midbrain)。*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。



圖九、*Cdk15* 基因剔除小鼠在不同腦區多巴胺代謝酶之表現量。(A) 西方點墨法顯示野生型小鼠 (WT, $n = 4$) 與 *Cdk15* 基因剔除小鼠 (*Cdk15^{-/-}*, $n = 4$) 各腦區中 monoamine oxidase A (MAOA)、monoamine oxidase B (MAOB) 和 catechol-O-Methyl Transferase (COMT) 的蛋白質含量, GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現量之定量結果。計算方式為 *Cdk15* 基因剔除小鼠除以同胎野生型公鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。mPFC, 前額皮質 (medial prefrontal cortex); CTX-r, 前端皮質 (rostral cortex); ST-r, 前端紋狀體 (rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體 (caudal striatum); VMB, 中腦腹側區 (ventral midbrain)。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。

第五節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在 ADHD 相關蛋白之表現

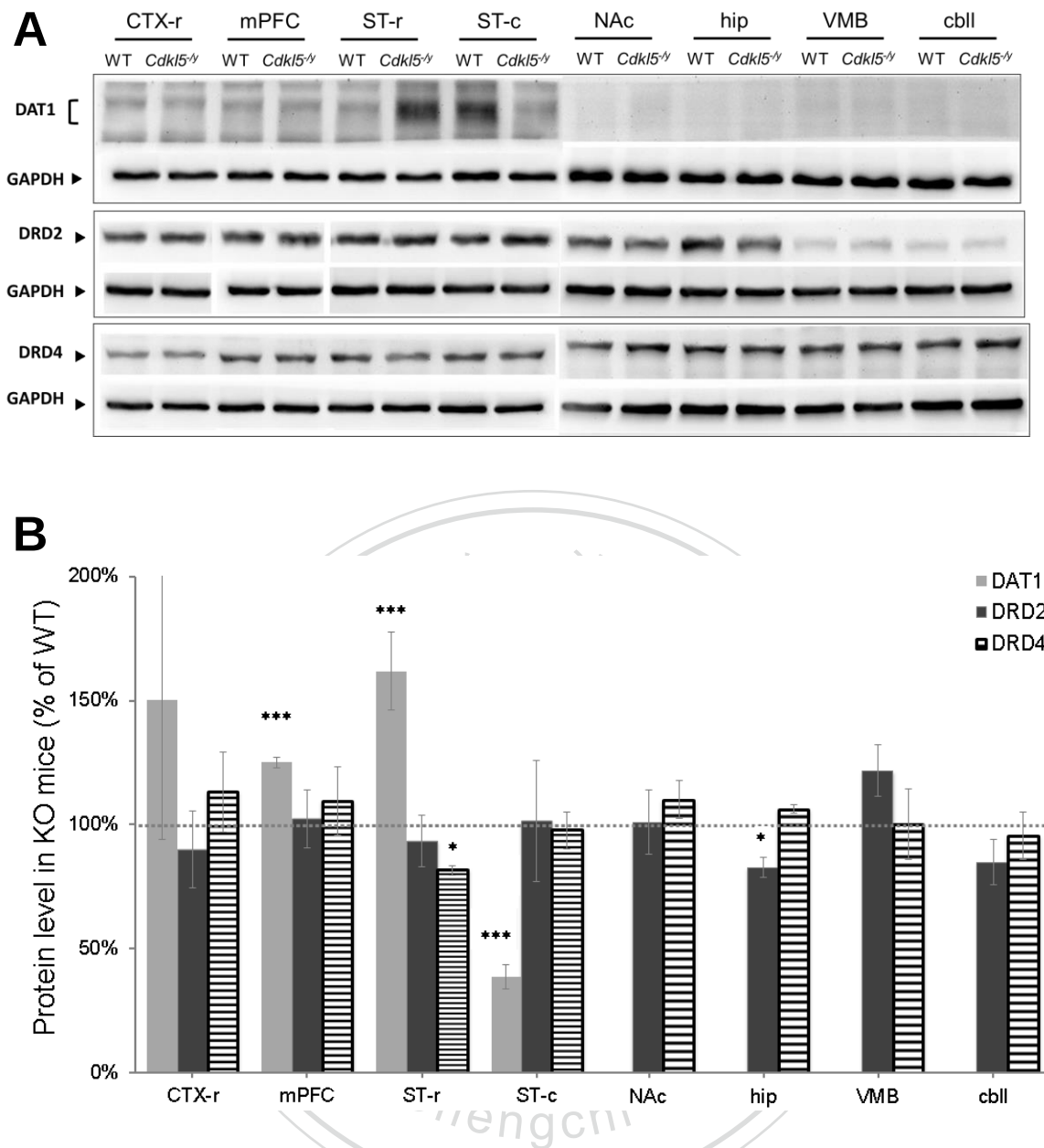
ADHD 在先前的研究發現與兒茶胺類神經傳遞物質的不平衡有高度關係(Faraone & Biederman, 2002)，其中又以多巴胺與 ADHD 最密切相關。由於(1) 腦造影相關研究發現 ADHD 患者有多巴胺系統相關分子有明顯不同；(2)多巴胺系統相關之基因上有所缺失的動物模式，多數具有類似 ADHD 之症狀；(3) ADHD 的治療藥物多數為作用於多巴胺系統上的興奮劑藥物；科學家們開始致力於在多巴胺系統中尋找 ADHD 的致病候選基因。Gizer et al (2009) 針對過去十五年有關 ADHD 的致病基因進行整合分析(meta-analysis)發現，與 ADHD 具有高度相關性且又屬於多巴胺系統的基因主要轉錄多巴胺轉運子(dopamine transporter, *DAT1*)、多巴胺第二型受體(dopamine D2 receptor, *DRD2*)及多巴胺第四型受體(dopamine D4 receptor, *DRD4*)。由於 *Cdkl5* 突變小鼠也表現出許多 ADHD 之症狀，因此我們認為這些分子在 *Cdkl5* 突變小鼠之大腦各區可能有所改變。

首先，我們以西方轉漬法檢驗 *DAT1* 的蛋白含量，發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠相較於同胎公鼠於內側前額皮質和前端紋狀體的 *DAT1* 含量有顯著的增加 (mPFC: 125.02 ± 2.23 % of WT, $n = 3$, $p < 0.001$; ST-r: 161.78 ± 15.67 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)；而後端紋狀體的 *DAT1* 蛋白表現則顯著減少(38.70 ± 4.88 % of WT, $n = 3$, $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)。前端皮質的 *DAT1* 含量則與野生型小鼠無明顯差異 (150.24 ± 56.38 % of WT, $n = 3$, $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)。其他腦區如阿控伯氏核、海馬迴、中腦腹側區、小腦則因表現量過低不列入計算。

DRD2 的蛋白含量只有在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的海馬迴有顯著的減少 (82.77 ± 4.04 % of WT, $n = 3$, $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)，其餘腦區則無明顯變化 (CTX-r: 89.92 ± 15.50 % of WT, $n = 3$; mPFC: 102.35 ± 11.78 % of WT, $n = 3$; ST-r: 93.38 ± 10.36 % of WT, $n = 3$; ST-c: 101.47 ± 24.27 % of WT, $n = 3$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; NAc: 101.01 ± 12.94 % of WT, $n = 3$; VMB: 121.78 ± 10.52 % of WT, $n = 3$; CblI: 84.79 ± 9.11 % of WT, $n = 3$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)。

最後，DRD4 只在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前端紋狀體中表現量有顯著的減少
(81.70 ± 1.94 % of WT, $n = 3$, $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)，其餘腦區則無
明顯變化 (CTX-r: 113.20 ± 16.23 % of WT, $n = 3$; mPFC: 109.43 ± 13.70 % of WT, $n =$
 3 ; ST-c: 97.77 ± 7.42 % of WT, $n = 3$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; NAc: 110.01 ± 7.58 %
of WT, $n = 3$; hip: 106.15 ± 1.70 % of WT, $n = 3$; VMB: 100.30 ± 14.14 % of WT, $n = 3$;
Cbl: 95.5 ± 9.45 % of WT, $n = 3$; Student's *t*-test; 圖十 A, B)。綜合上述之結果，顯示
缺少 CDKL5 蛋白下，會造成 ADHD 相關蛋白質的變化。





圖十、*Cdk15* 基因剔除小鼠全腦各區 ADHD 相關蛋白之表現。(A) 野生型小鼠 (WT, $n = 4$) 及 *Cdk15* 基因剔除小鼠 (*Cdk15*^{-/-}; $n = 4$) 之特定腦區中 dopamine transporter (DAT1)、dopamine D2 receptor (DRD2) 和 dopamine D4 receptor (DRD4) 的蛋白質含量，GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現之定量結果。計算方式為 *Cdk15* 突變小鼠的蛋白表現量除以同胎野生型公鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。CTX-r, 前端皮質(rostral cortex); mPFC, 前額皮質(medial prefrontal cortex); ST-r, 前端紋狀體(rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體(caudal striatum); NAc, 阿控伯氏核(nucleus accumbens); Hip, 海馬迴(hippocampus); VMB, 中腦腹側區(ventral midbrain); Cbll, 小腦(cerebellum). *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test。

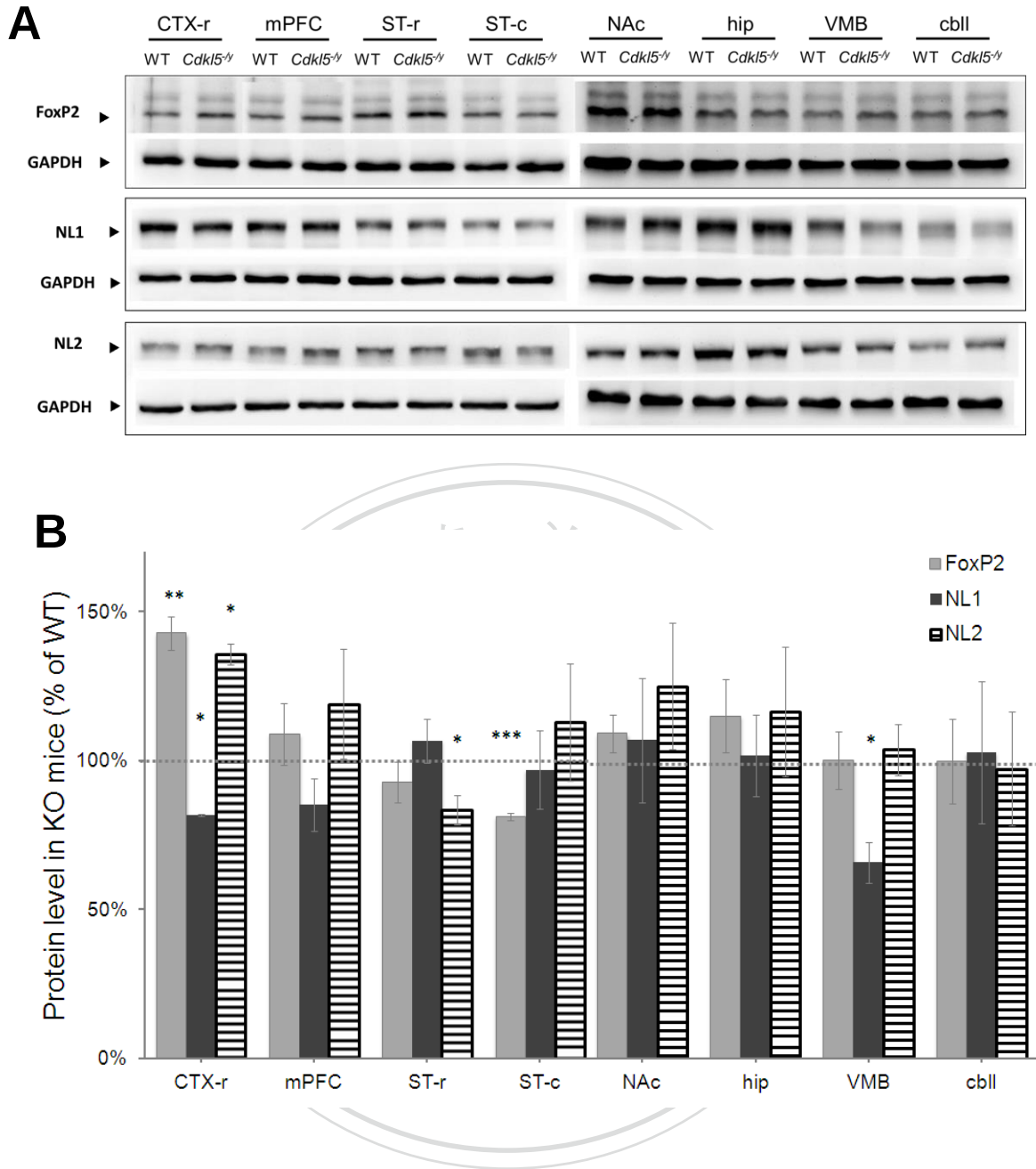
第六節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中 ASD 相關蛋白之表現

由於本研究發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在語言溝通上有嚴重的缺失(圖二)，我們因此認為這些小鼠的神經迴路中和語言學習相關的分子可能有所改變。目前已知，叉頭框蛋白 P2 (forkhead box protein P2, FoxP2) 在語言功能扮演重要的角色。研究發現，帶有點突變的 FoxP2 轉殖小鼠在與母鼠分離時的超音波鳴叫有明顯的減少，並伴隨小腦中 purkinje 細胞不正常的發育(Fujita *et al.*, 2008)。而後續的研究更進一步指出，FoxP2 是經由參與大腦皮質—基底核迴路(cortico-basal ganglia circuits)來影響語言的發展(Enard, 2011)。因此，我們接下來分析了 *Cdkl5* 基因剔除小鼠大腦各區中 FoxP2 蛋白的表現量。結果發現，*Cdkl5* 基因剔除小鼠 FoxP2 蛋白在前端皮質含量有明顯增加 (142.66 ± 5.75 % of WT, $n = 3$; $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B)，而後端紋狀體則顯著減少 (81.12 ± 1.32 % of WT, $n = 3$; $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B); 其餘腦區則無明顯改變 (mPFC: 108.77 ± 10.24 % of WT, $n = 4$; ST-r: 92.67 ± 6.68 % of WT, $n = 4$; NAc: 110.11 ± 6.39 % of WT, $n = 4$; Hip: 116.10 ± 12.34 % of WT, $n = 4$; VMB: 101.10 ± 9.87 % of WT, $n = 4$; Cbll: 100.78 ± 14.40 % of WT, $n = 4$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B)。而本研究在負責語言學習之一的腦區—小腦中，並未發現 FoxP2 蛋白表現量明顯的改變，可能是由於 CDKL5 主要表現於前端腦區而致。因此綜合以上結果，*Cdkl5* 基因剔除小鼠的語言溝通障礙可能肇因於皮質—基底核迴路中 FoxP2 蛋白表現的改變。

透過族譜分析的研究顯示，小孩中若一人為罹患 ASD，手足罹病的機率是一般家庭的四十五倍(Folstein & Rosen-Sheidley, 2001)，顯示 ASD 具有高度遺傳性，後續的研究便致力於尋找其致病候選基因。在這些候選基因當中，有關 Neuroligins (NLs) 家族蛋白相關的研究最為豐富，其中 NL 3 和 NL 4 已被報導為自閉症之致病基因(Jamain *et al.*, 2003)，然而卻較少研究提及 NL1 或 NL2 與自閉症的關聯。由於 NL1 主要分布於興奮性突觸(Song *et al.*, 1999)；而 NL2 則分佈在抑制性突觸較多(Varoqueaux *et al.*, 2004)，有鑒於 CDKL5 與突觸的形成息息相關，因此我們推論，在缺少 CDKL5 蛋白下，興奮性或抑制性突觸形成相關的分子的表現有可能改變。

我們首先以西方點墨法檢驗 NL1 蛋白在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中的分布，發現在前端皮質與中腦腹側區有顯著的減少 (CTX-r: 81.58 ± 0.48 % of WT, $n = 3$; $p < 0.001$; VMB: 66.4 ± 6.85 % of WT, $n = 3$; $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B) , 而其餘腦區則無明顯改變 (mPFC: 84.96 ± 8.77 % of WT, $n = 3$; ST-r: 106.65 ± 7.35 % of WT, $n = 3$; ST-c: 96.81 ± 13.13 % of WT, $n = 3$; NAc: 107.83 ± 20.94 % of WT, $n = 3$; Hip: 102.72 ± 13.94 % of WT, $n = 3$; Cbll: 103.73 ± 24.23 % of WT, $n = 3$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B) 。

相較於 NL1, NL2 的蛋白表現量在前端皮質卻是顯著增加 (135.74 ± 3.52 % of WT, $n = 3$; $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B) , 而在前端紋狀體有顯著的減少 (83.33 ± 4.93 % of WT, $n = 3$; $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B) , 其餘腦區則無明顯改變 (mPFC: 118.97 ± 18.37 % of WT, $n = 3$; ST-c: 113.00 ± 19.65 % of WT, $n = 3$; NAc: 126.26 ± 21.39 % of WT, $n = 3$; hip: 117.57 ± 21.92 % of WT, $n = 3$; VMB: 104.69 ± 8.65 % of WT, $n = 3$; Cbll: 98.27 ± 19.40 % of WT, $n = 3$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十一 A, B) 。先前的研究報導發現, NL1 基因剔除小鼠具有空間學習障礙以及重複性的刻板行為(Blundell et al., 2010), 這部分與本實驗 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之行為表型相符。



圖十一、*Cdk15* 基因剔除小鼠全腦各區在 ASD 相關蛋白之表現。(A) 野生型小鼠 (WT, $n = 3$) 與 *Cdk15* 基因剔除小鼠 (*Cdk15*^{-/-}, $n = 3$) 各腦區中 forkhead box protein P2 (FoxP2)、neuroligin 1(NL1)及 neuroligin 2 (NL2)的蛋白質含量, GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現之定量結果。計算方式為 *Cdk15* 突變小鼠蛋白表現量除以同胎野生型公鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。CTX-r, 前端皮質(rostral cortex); mPFC, 前額皮質(medial prefrontal cortex); ST-r, 前端紋狀體(rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體(caudal striatum); NAc, 阿控伯氏核(nucleus accumbens); Hip, 海馬迴 (hippocampus); VMB, 中腦腹側區(ventral midbrain); Cbll, 小腦 (cerebellum). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; Student's *t*-test。

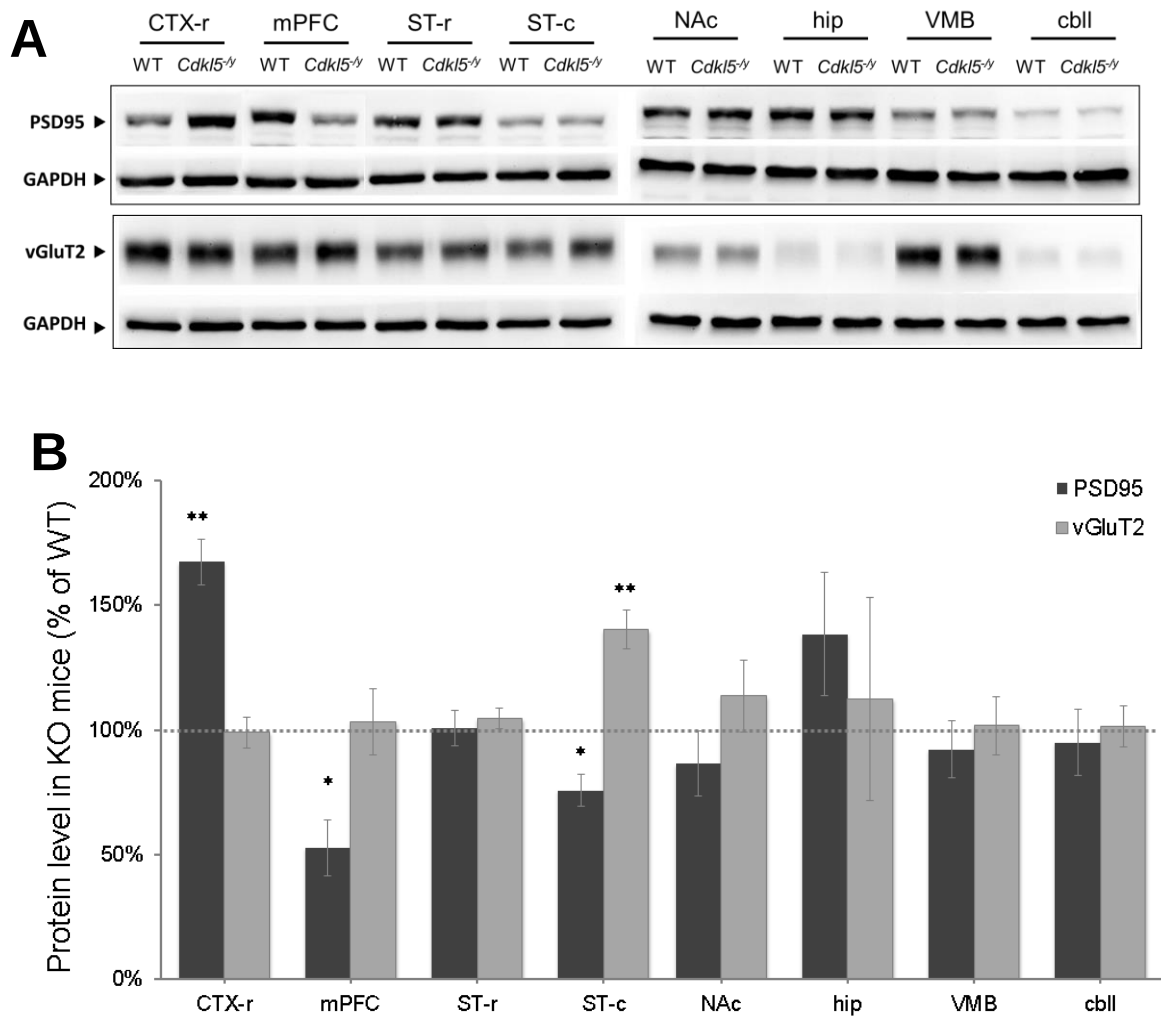
第七節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在興奮性突觸相關蛋白之表現

研究發現，在離體培養的神經元若缺少 CDKL5 將會抑制興奮性突觸小棘的形成與生長，顯示 CDKL5 在突觸發育中扮演重要的角色(Zhu et al., 2013)。進一步的研究指出，CDKL5 會磷酸化細胞黏著分子 netrin-G1 ligand(NGL-1) 的 Ser631 的位點，使 NGL-1 可以與突觸後密度蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95) 結合，進而形成突觸 (Raymond et al., 2013)。基於上述報導，我們推論 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的興奮性突觸可能會因為缺少 CDKL5 蛋白而干擾突觸形成，影響 PSD95 的表現。因此我們首先檢測腦中各區 PSD95 蛋白表現。值得注意的是，我們發現 PSD95 在內側前額皮質與後端紋狀體的表現量有顯著的減少 (mPFC: 52.71 ± 11.28 % of WT, $n = 3$; $p < 0.05$; ST-c: 75.73 ± 6.54 % of WT, $n = 3$; $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十二 A, B)，然而在前端皮質的 PSD95 蛋白表現量卻是明顯增加 (167.41 ± 9.29 % of WT, $n = 3$; $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖十二 A, B); 其餘腦區則無明顯改變 (ST-r: 100.64 ± 7.10 % of WT, $n=3$; NAc: 86.42 ± 13.07 % of WT, $n = 4$; Hip: 138.36 ± 24.69 % of WT, $n = 4$; VMB: 92.14 ± 11.43 % of WT, $n = 4$; Cbll: 94.95 ± 13.28 % of WT, $n = 4$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十二 A, B)。

根據上述之發現，缺少 CDKL5 蛋白會改變腦中 PSD95 蛋白的表現，有可能影響興奮性突觸的結構，而改變興奮性突觸的功能。麩胺酸 (glutamate) 是哺乳類中樞神經系統主要的興奮性神經傳導素，從突觸前神經元的突觸小泡 (synaptic vesicle) 被釋放到突觸間隙 (synaptic cleft) 後，結合到突觸後神經元的麩胺酸受體或被麩胺酸轉運子回收等待下次釋放。因此我們接下來檢測位於突觸前負責將麩胺酸回收至囊泡以利下次釋放的麩胺酸囊泡轉運子 (vesicular glutamate transporter 2, vGluT2) 之蛋白表現量。結果發現，在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠中，僅後端紋狀體的 vGluT2 表現量有顯著的增加 (140.16 ± 4.16 % of WT, $n = 4$; $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖十二 A, B)，其餘腦區中 vGluT2 的蛋白含量則無明顯改變 (CTX-r: 99.07 ± 6.20 % of WT, $n = 4$; mPFC: 103.27 ± 13.40 % of WT, $n = 4$; ST-r: 104.61 ± 4.16 % of WT, $n = 4$; NAc: 113.54 ± 14.21 % of WT, $n = 4$; hip: 112.53 ± 40.7 % of WT, $n = 4$; VMB: 101.75 ± 11.59 % of WT, $n = 4$; Cbll:

101.22 ± 8.26 % of WT, $n = 4$; $p > 0.05$; Student's t -test; 圖十二 A, B)。顯示缺少 CDKL5 蛋白會造成特定腦區中興奮性突觸相關蛋白質含量的變化。





圖十二、*Cdkl5* 基因剔除小鼠在興奮性突觸相關蛋白之表現。(A) 野生型小鼠 (WT, $n = 4$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, $n = 4$) 各腦區中 postsynaptic density protein 95 (PSD95)和 Vesicular glutamate transporter 2 (vGluT2)的蛋白質含量, GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現之定量結果。計算方式為 *Cdkl5* 突變小鼠除以同胎野生型小鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。CTX-r, 前端皮質(rostral cortex); mPFC, 前額皮質(medial prefrontal cortex); ST-r, 前端紋狀體(rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體(caudal striatum); NAc, 阿控伯氏核(nucleus accumbens); Hip, 海馬迴 (hippocampus); VMB, 中腦腹側區(ventral midbrain); Cbl, 小腦 (cerebellum). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, Student's *t*-test。

第八節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在抑制性神經元相關蛋白之表現

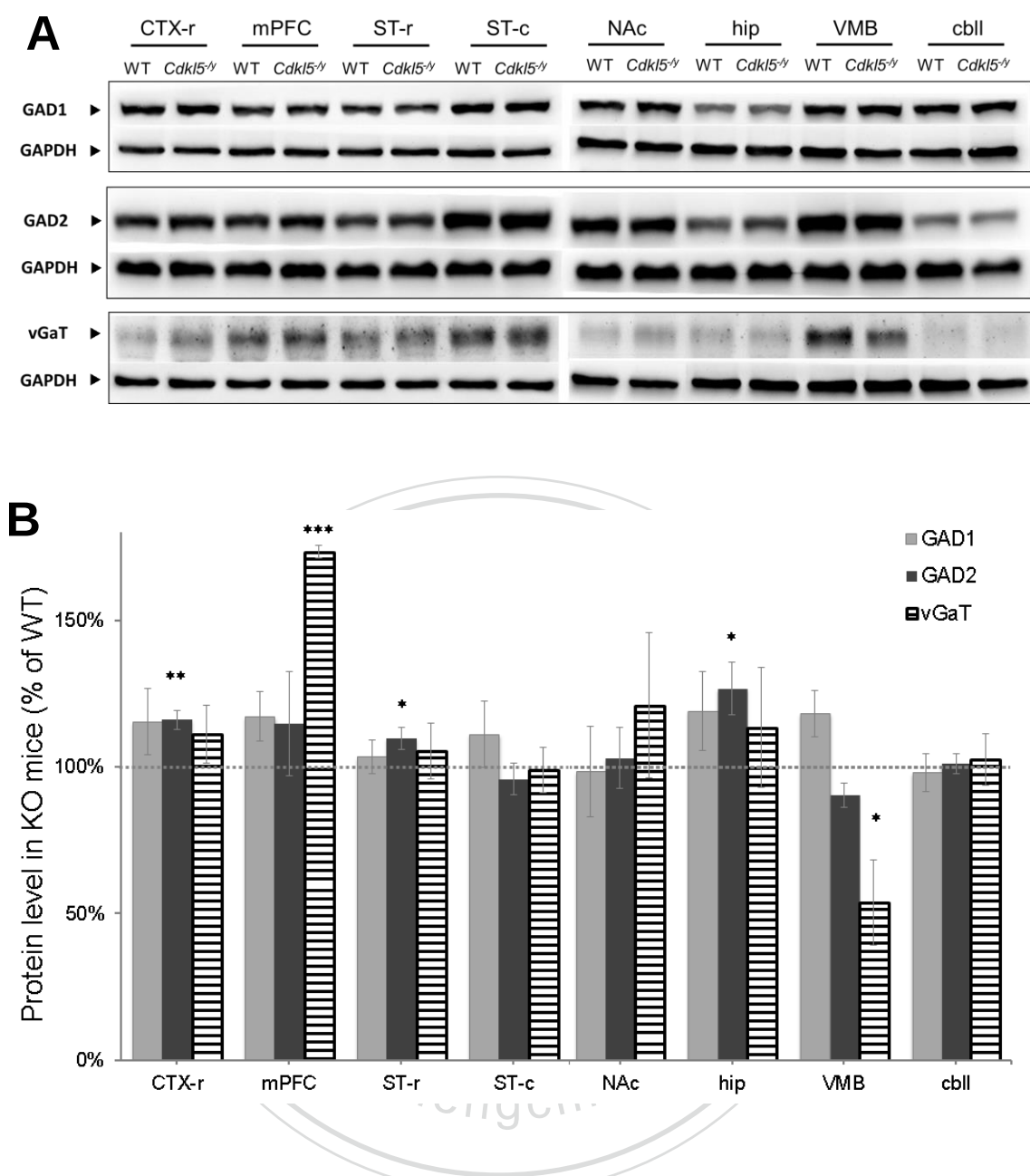
大腦中神經訊號的傳遞取決於神經元的興奮程度的動態平衡，因此興奮與抑制的平衡 (excitation-inhibition balance, E-I balance) 扮演著重要角色。先前的研究也發現增加興奮性神經元的活性或是減少抑制性神經元的功能，可以有效地改善 ASD 中的社交能力缺失及認知功能障礙 (Rubenstein & Merzenich, 2003; Rubenstein, 2010; Vattikuti & Chow, 2010)，因此我們接著探討 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的抑制性神經元相關蛋白表現量是否有所差異。

我們利用西方轉漬法測量了腦中主要的抑制性神經傳導素 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, GABA) 的合成酶—麩胺酸脫羧酶第一型 (glutamic acid decarboxylase 1, GAD1) 與麩胺酸脫羧酶第二型 (glutamic acid decarboxylase 2, GAD2) 於各腦區中的蛋白表現量。結果顯示，GAD1 在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的各腦區表現量相較於野生型小鼠全無差異 (CTX-r: 115.29 ± 11.25 % of WT, $n = 3$; mPFC: 117.12 ± 8.33 % of WT, $n = 3$; ST-r: 103.37 ± 5.78 % of WT, $n = 3$; ST-c: 111.12 ± 11.29 % of WT, $n = 3$; NAc: 98.39 ± 15.54 % of WT, $n = 3$; Hip: 118.98 ± 13.30 % of WT, $n = 3$; VMB: 118.11 ± 7.74 % of WT, $n = 3$; Cbll: 97.98 ± 6.56 % of WT, $n = 3$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十三 A, B)。但 GAD2 在前端皮質、前端紋狀體與海馬迴有顯著的增加 (CTX-r: 116.07 ± 3.25 % of WT, $n = 4$; $p < 0.01$; ST-r: 109.71 ± 3.75 % of WT, $n = 4$; $p < 0.05$; Hip: 126.63 ± 9.03 % of WT, $n = 4$; $p < 0.01$; Student's *t*-test; 圖十三 A, B)，其餘腦區則無明顯改變 (mPFC: 114.75 ± 17.79 % of WT, $n = 4$; ST-c: 95.86 ± 5.31 % of WT, $n = 4$; NAc: 102.94 ± 10.38 % of WT, $n = 4$; VMB: 90.32 ± 4.27 % of WT, $n = 4$; Cbll: 101.13 ± 3.48 % of WT, $n = 4$; 圖十三 A, B)。

我們進一步探討負責將 GABA 回收至囊泡的 vesicular GABA transporter (vGAT) 的蛋白表現量，發現在內側前額皮質 vGAT 蛋白表現明顯的增加 (173.25 ± 2.21 % of WT, $n = 3$; $p < 0.001$; Student's *t*-test; 圖十三 A, B)；而在中腦腹側區則是明顯減少 (53.73 ± 14.50 % of WT, $n = 4$; $p < 0.05$; Student's *t*-test; 圖十三 A, B)；其餘腦區則無明顯改變 (CTX-r: 111.10 ± 9.90 % of WT, $n = 3$; ST-r: 105.48 ± 9.53 % of WT, $n = 3$;

ST-c: 98.85 ± 7.71 % of WT, $n = 3$; NAc: 120.96 ± 24.76 % of WT, $n = 4$; Hip: 113.41 ± 20.4 % of WT, $n = 4$; Cbll: 102.59 ± 8.78 % of WT, $n = 4$; $p > 0.05$; Student's *t*-test; 圖十三 A, B), 顯示缺少 CDKL5 蛋白可能會影響內側前額皮質及中腦腹側區的 GABA 回收機制。





圖十三、*Cdkl5* 基因剔除小鼠在抑制性神經元相關蛋白之表現。(A) 野生型小鼠 (WT, $n = 4$) 與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 (*Cdkl5*^{-/-}, $n = 4$) 各腦區中 glutamic acid decarboxylase 1 (GAD1), glutamic acid decarboxylase 2 (GAD2) 和 vesicular GABA transporter (VGaT) 的蛋白質含量, GAPDH 為定量控制組。(B) 上述蛋白質表現之定量結果。計算方式為 *Cdkl5* 突變小鼠除以同胎野生型小鼠之百分比率。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。CTX-r, 前端皮質(rostral cortex); mPFC, 前額皮質(medial prefrontal cortex); ST-r, 前端紋狀體(rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體(caudal striatum); NAc, 阿控伯氏核(nucleus accumbens); Hip, 海馬迴(hippocampus); VMB, 中腦腹側區(ventral midbrain); Cbll, 小腦(cerebellum). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; Student's *t*-test.

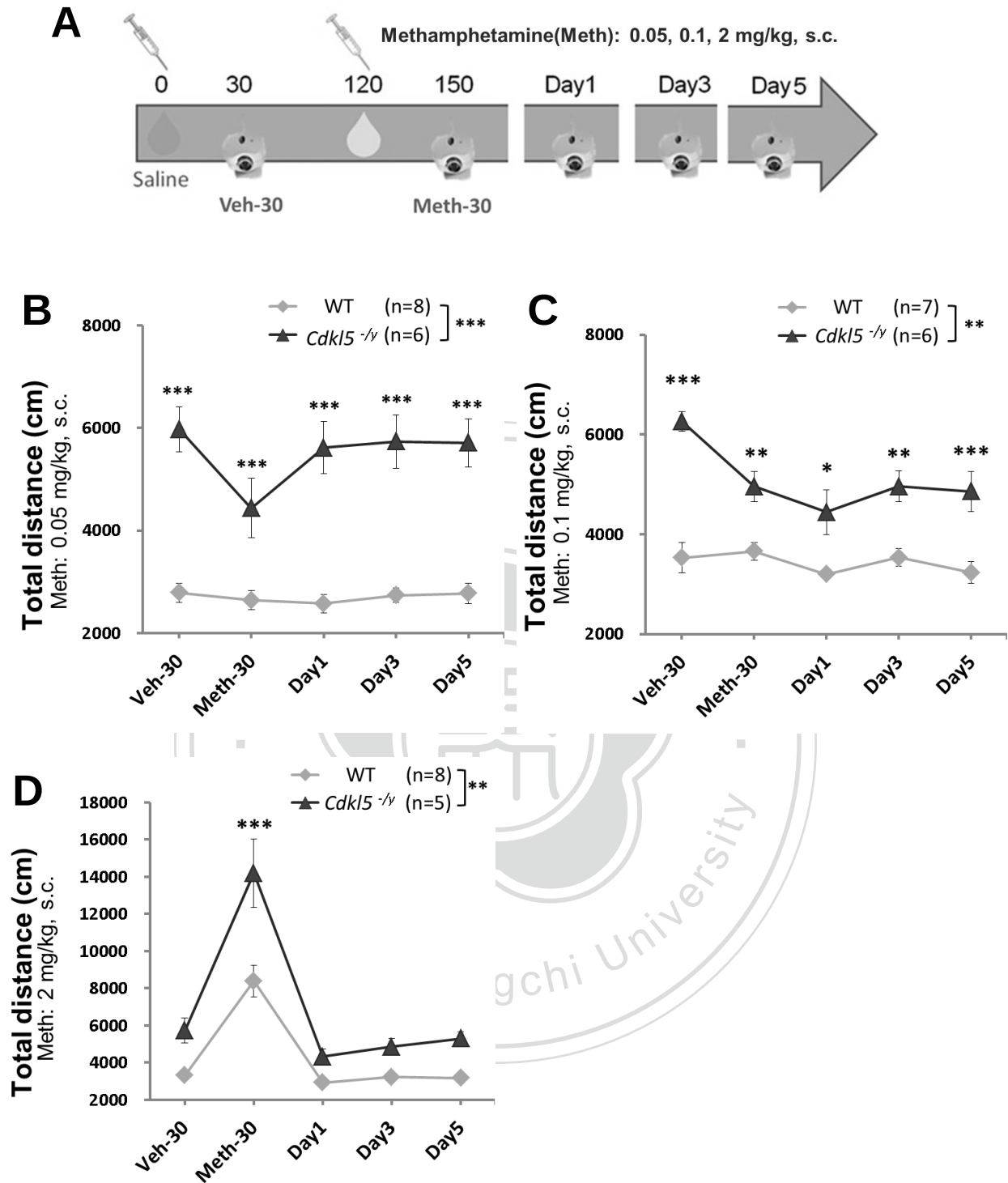
第九節 甲基安非他命可改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之過動症狀

基於在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠行為表型分析的結果，以及多巴胺含量與合成蛋白的改變，我們嘗試使用目前用來 ADHD 的心理興奮劑 (psychostimulants)- 甲基安非他命 (methamphetamine, Meth)，來探討其在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的治療效果。

先前許多文獻證實，心理興奮劑，如安非他命 (amphetamine) 和 Meth，是藉由調節邊緣系統與基底核的胞外多巴胺含量，改變啮齒類動物的運動行為表現 (Sharp *et al.*, 1987; Robinson & Camp, 1990; Kuczenski *et al.*, 1991)。我們首先讓待測鼠皮下注射 0.05, 0.1, 2 mg/kg Meth，並於注射後的三十分鐘 (Meth-30)、一天 (Day1)、三天 (Day3) 與五天 (Day5) 觀察其運動能力之表現(圖十四 A)。在施打最低劑量 0.05 mg/kg Meth 下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠於各觀察時間點都顯著的比野生型小鼠有較多的移動距離 (genotype effect: $F_{(1,12)} = 50.51, p < 0.001$; repeated measure two-way ANOVA; 圖十四 B)。進一步分析此劑量在不同基因型的改變，發現在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠注射 Meth 後的三十分鐘(Meth-30)相較於施打生理實驗水後三十分鐘 (Veh-30) 之移動距離有顯著降低 ($F_{(4,29)} = 5.772, p < 0.01$; 圖十四 B)。而在野生型小鼠，注射此劑量的 Meth 後不同時間點與 Veh-30 相比皆無顯著差異 ($F_{(4,34)} = 1.402, p > 0.05$; 圖十四 B)。

在 0.1 mg/kg Meth 之劑量下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠於各觀察時間點仍顯著的比野生型小鼠有較多的移動距離 (genotype effect: $F_{(1,11)} = 28.34, p < 0.01$; repeated measure two-way ANOVA; 圖十四 C)。進一步分析在不同基因型下之藥物效果，發現此劑量可有效且長久的改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的過動行為，從注射後三十分鐘至第五天，都有顯著性的差異 ($F_{(4,29)} = 10.43, p < 0.001$; repeated measure one-way ANOVA; 圖十四 C)；而在野生型小鼠，注射此劑量的 Meth 後不同時間點與 Veh-30 相比均無顯著差異 ($F_{(4,39)} = 1.062, p > 0.05$; repeated measure one-way ANOVA; 圖十四 C)。

除此之外，高劑量 2mg/kg Meth 在投予 *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型小鼠 30 分鐘後，運動能力均顯著提升 (WT: $F_{(4,34)} = 32.76, p < 0.001$; *Cdkl5*^{-/-}: $F_{(4,24)} = 12.25, p < 0.01$; repeated measure one-way ANOVA; 圖十四 D)。綜合上述之實驗結果，顯示投予 0.1 mg/kg Meth 可部分改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之過動症狀。



圖十四、*Cdk15* 基因剔除小鼠在投予不同劑量之甲基安非他命後於敞箱活動能力之表現。(A) 為注射甲基安非他命測量敞箱活動能力之實驗流程圖。(B-D) *Cdk15* 基因剔除小鼠與野生型小鼠於皮下注射 0.05 mg/kg (B), 0.1 mg/kg (C) 或 2 mg/kg (D) 甲基安非他命前後不同觀察時間點，在敞箱實驗中運動能力之表現。X 軸分別為：注射生理食鹽水後三十分鐘 (Veh-30)和注射甲基安非他命後 30 分鐘(Meth-30)、1 天(Day1)、3 天(Day3)與 5 天(Day5)；Y 軸為在敞箱實驗中的總移動距離(單位：公分)。柱狀圖皆以平均值 ± 標準誤差表示。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, 各觀察時間點下，*Cdk15* 基因剔除小鼠與野生型小鼠進行統計比較； repeated measure two-way ANOVA。

第十節 利他能可改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之部分症狀

目前使用於 ADHD 第一線用藥為利他能，其主要成分為派醋甲酯 (methylphenidate)，在藥理分類上屬於中樞神經興奮劑的一種，藥效約三到四小時，目前另有長效型製劑，可增強藥效維持至十二小時。利他能目前在研究及醫療領域已廣泛被使用超過三十年，此藥可有效的降低 ADHD 病童之過動與衝動症狀，並增加注意力，進而增加社交技巧及情緒控制。因此，我們認為利他能有可能可以改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的過動症狀。

一、 利他能劑量之選擇

目前有許多關於 ADHD 的動物模式，無論是基因操弄小鼠，或是檢測自發性滾輪行為(voluntary wheel running)篩選出過動之大鼠，皆發現使用利他能可有效改善其過動症狀(Dougherty *et al.*, 1999; McFadyen *et al.*, 2002; Rhodes *et al.*, 2003)。根據上述之文獻，我們首先測試不同劑量之利他能在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動症狀的治療效果：以皮下注射投予待測鼠不同劑量 (1, 20, 25, 30 mg/kg) 的利他能 後 30 分鐘(Ritalin-30)、一天(Day1)與三天(Day3)，觀察其運動能力之表現(圖十五 A)。

在最低劑量 1 mg/kg 下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠於各觀察時間點都顯著的比野生型小鼠有較多的移動距離 (genotype effect: $F_{(1,21)} = 14.46, p < 0.01$; 圖十五 B)，與先前實驗結果相同(圖四)。而此劑量無論是在野生型或 *Cdkl5* 基因剔除小鼠各觀察時間點與 Veh-30 相比，皆無明顯差異 (WT: $F_{(4,19)} = 1.285, p > 0.05$; *Cdkl5*^{-/-}: $F_{(3,15)} = 0.9581, p > 0.05$; one-way ANOVA, 圖十五 B)。因此選擇此劑量做為後續實驗的控制劑量。

若劑量增加至 20 mg/kg 劑量下，我們發現在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠各觀察時間點與 Veh-30 相比均無明顯的藥物效果 ($F_{(3,9)} = 0.4308, p > 0.05$; one-way ANOVA, 圖十五 C); 而在野生型小鼠則於 Ritalin-30 所測得之移動距離有顯著增加 ($F_{(3,11)} = 48.01, p < 0.001$; one-way ANOVA, 圖十五 C)。投予 25 mg/kg 之劑量與 20mg/kg 趨勢相同，在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠均無明顯的效果 ($F_{(3,15)} = 2.304, p > 0.05$; one-way ANOVA, 圖十五 D); 但在野生型小鼠則同樣於 Ritalin-30 所測得之移動距離有顯著增加 ($F_{(3,11)}$)

= 27.29, $p < 0.001$; one-way ANOVA, 圖十五 D)。

最後，本實驗最高劑量也是多數文獻中所使用的劑量 30mg/kg，於注射後 30 分鐘，顯著的增加野生型公鼠的移動距離($F_{(3,15)} = 11.19, p < 0.05$; 圖十五 D)，但相反地卻可顯著減少 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的移動距離 ($F_{(3,15)} = 7.752, p < 0.05$; repeated measure one-way ANOVA; 圖十五 D)，如此相反的藥物效果稱為 paradoxical effect，與先前相關報導相符合(Noaín *et al.*, 2006)，因此選擇此劑量做為後續實驗的有效劑量。

在確認後續實驗所應注射之利他能劑量後，我們接著觀察利他能在不同劑量下長時間的藥物效果。投予待測鼠不同劑量之利他能後，觀察其兩小時內敞箱活動力之變化。無效劑量 1 mg/kg 利他能作用下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠相較於野生型小鼠總移動距離明顯增加 (WT-1mg vs *Cdkl5*^{-/-}-1mg: $F_{(1,66)} = 36.14, p < 0.0001$; repeated measure two-way ANOVA; 圖十六 A)，此結果與先前敞箱實驗之結果一致(圖四)，顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有過動之症狀。隨後發現在投予 30 mg/kg 利他能後四十分鐘，野生型小鼠的敞箱活動力有明顯增加，並持續到兩小時 (WT-1mg vs WT-30mg: $F_{(1,110)} = 111.6, p < 0.0001$; repeated measure two-way ANOVA; 圖十六 B)。而在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠投予有效劑量 30 mg/kg 利他能後，立即降低原本過動之症狀，並持續至注射後五十分鐘。(*Cdkl5*^{-/-}-1mg vs *Cdkl5*^{-/-}-30mg: $F_{(1,11)} = 4.092, p < 0.0001$; repeated measure two-way ANOVA; 圖十六 C)。由於在注射後三十至四十分鐘 *Cdkl5* 基因剔除小鼠改善過動之效果最穩定 (*Cdkl5*^{-/-}-1mg vs *Cdkl5*^{-/-}-30mg $F_{(3,18)} = 18.59, p < 0.0001$; one-way ANOVA; 圖十六 D)，我們因此選擇此時間點來進行後續之行為實驗觀察及生化分析。

二、利他能可有效改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動之症狀

在確認有效、無效劑量以及藥效產生最大效果的時間後，首先我們分析利他能在過動症狀之治療效果，實驗流程如圖十七 A 所示，於皮下注射利他能後三十分鐘進行敞箱實驗觀察待測鼠之活動能力表現。

當注射無效劑量 1mg/kg 時，*Cdkl5* 基因剔除小鼠相較於野生型公鼠，移動距離

較長 ($F(3,36) = 48.58, p < 0.001$; one-way ANOVA; 圖十七 B)、平均速度較大 ($F(3,36) = 54.25, p < 0.05$; one-way ANOVA; 圖十七 C) 且最大速度較快 ($F(3,36) = 20.60, p < 0.05$; one-way ANOVA; 圖十七 D), 與先前實驗結果一致(圖四 B)。

在注射有效劑量 30mg/kg 時, *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型公鼠相比, 反而有較短的移動距離($p < 0.001$; two-way ANOVA)、較慢的平均速度 ($p < 0.001$; two-way ANOVA) 及較小的最大速度 ($p < 0.001$; two-way ANOVA)。而比較相同基因型下的藥物效果時, 發現野生型公鼠中有效劑量與無效劑量兩組別相比, 無論在移動距離、平均速度及最大速度皆顯著增加 ($p < 0.001$; two-way ANOVA; 圖十七 B, C, D), 顯示利他能在野生型公鼠會增加其運動表現; 而在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠中, 無論在移動距離、平均速度及最大速度則是明顯降低 ($p < 0.001$; two-way ANOVA; 圖十七 B, C, D), 顯示利他能在此時間點可以整體改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之過動現象。

三、利他能可有效改善刻板行為

接著我們開始逐一檢視利他能在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠不同症狀之改善。首先探討注射利他能在刻板行為之治療效果, 於皮下注射利他能後的三十分鐘觀察藥物效果, 實驗流程如圖十八 A 所示。

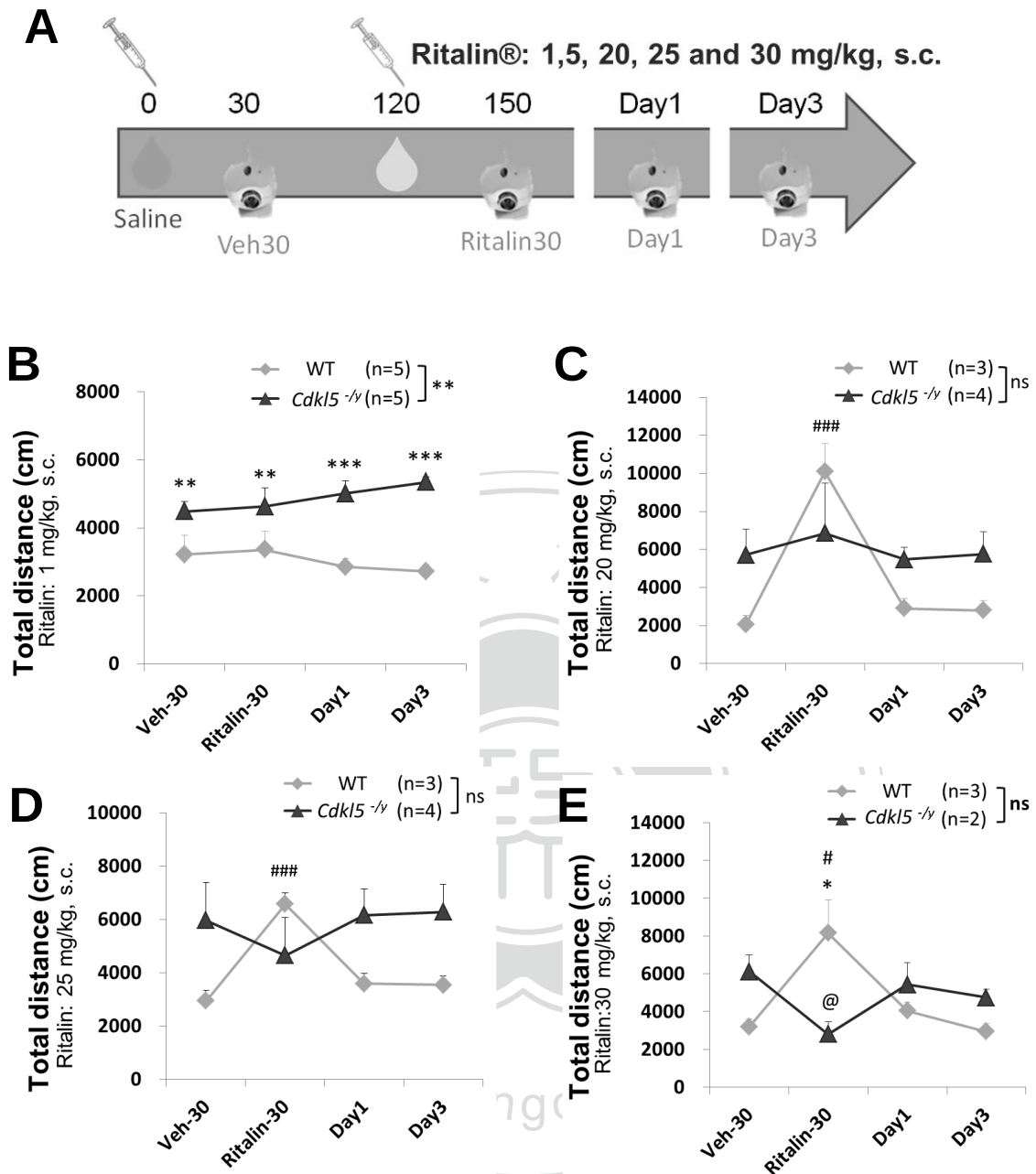
有鑑於先前在刻板行為實驗所得結果(圖三), 在藥物治療的部份我們主要針對野生型公鼠表現較多的「抬頭嗅聞」以及 *Cdkl5* 基因剔除小鼠特有的「挖掘墊料」兩個行為動作。首先我們發現, 無論施打 1mg/kg 或 30mg/kg 下, 野生型公鼠皆比 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較多抬頭嗅聞 ($F_{(1,22)} = 99.11, p < 0.001$; one-way ANOVA; 圖十八 B), 這部分與先前的實驗結果一致(圖三 B)。而在相同基因型中之有效與無效劑量相比則無統計差異 ($p > 0.05$; one-way ANOVA), 顯示利他能並不影響抬頭嗅聞行為。

至於挖掘墊料的行為, 在投予無效劑量 1mg/kg 之下, *Cdkl5* 基因剔除小鼠相較於野生型公鼠表現較多挖掘墊料行為 ($F_{(1,26)} = 71.75, p < 0.001$; one-way ANOVA; 圖十八 C), 這部分結果也與先前實驗結果相符 (圖三 C)。而投予有效劑量下, 無論野生型公鼠或 *Cdkl5* 基因剔除小鼠, 相同基因型中有效與無效劑量相比兩者皆達統計差異 ($p <$

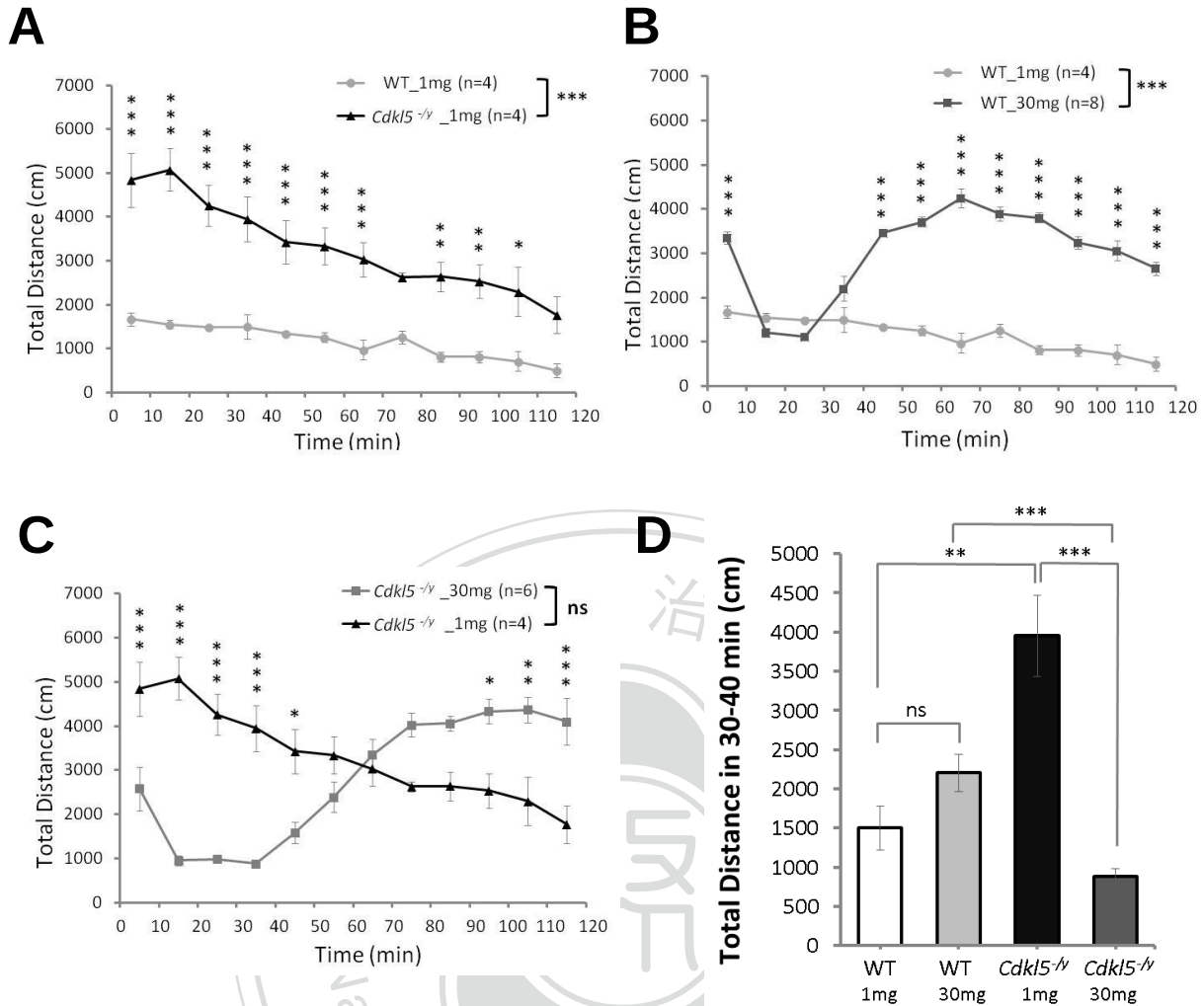
0.001; one-way ANOVA)，顯示利他能可有效改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠挖掘墊料之刻板行為。

四、 利他能無法改善社交溝通障礙

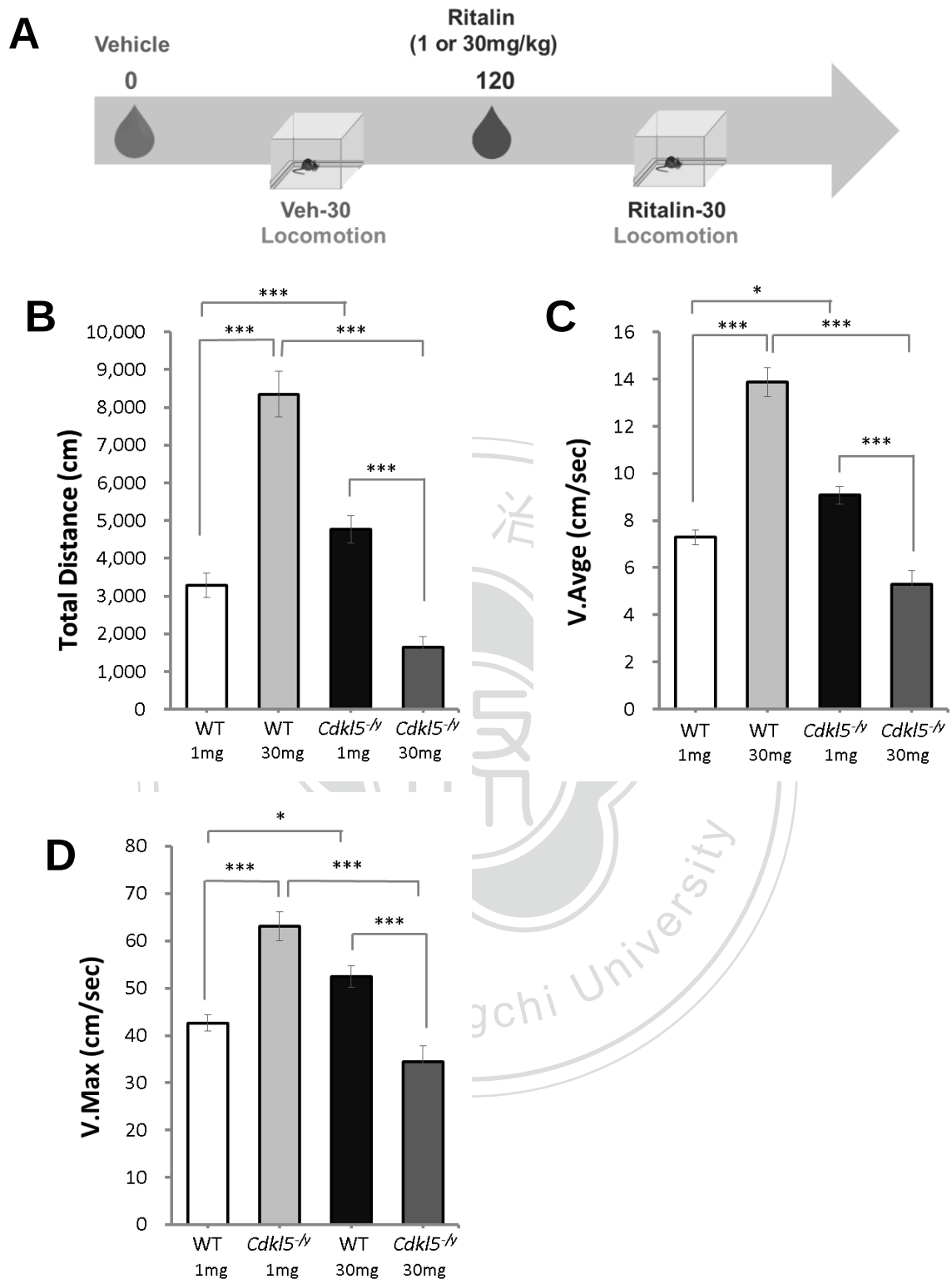
我們進一步分析利他能在母鼠誘發之超音波實驗之藥物效果。首先是注射控制組劑量 1mg/kg 三十分鐘後，發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在超音波鳴叫總次數 ($F_{(3,23)} = 21.52$, $p < 0.001$; two-way ANOVA；圖十九 A) 與超音波鳴叫延續時間 ($F_{(3,23)} = 17.52$, $p < 0.001$; one-way ANOVA；圖十九 B) 明顯少於野生型公鼠，這部分與先前實驗結果一致(圖二 B,C)。然而在投予有效劑量 30mg/kg 下，發現在野生型公鼠之超音波鳴叫總次數與超音波鳴叫延續總時間顯著降低 ($p < 0.001$ ；two-way ANOVA；圖十九 A, B)，而在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠中兩種劑量相比則無統計上顯著差異($p > 0.05$ ；two-way ANOVA；圖十九 A, B)，由上述實驗結果可得知，利他能無法改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠社交溝通之障礙。



圖十五、*Cdk15* 基因剔除小鼠投予不同劑量之利他能後於敞箱活動力之表現。(A)為注射利他能測量敞箱活動能力之實驗流程圖。(B-E) *Cdk15* 基因剔除小鼠與野生型小鼠於皮下注射 1 mg/kg (B), 20 mg/kg (C), 25 mg/kg (D) 及 30 mg/kg (E) 利他能前後不同時間點下，敞箱實驗中運動力之表現。X 軸：注射生理食鹽水後 30 分鐘 (Veh-30) 和注射利他能後 30 分鐘 (Ritalin-30)、1 天 (Day1) 與 3 天 (Day3)；Y 軸：敞箱測試中的總移動距離(單位：公分)。柱狀圖皆以平均值 ± 標準誤差表示。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, 各觀察時間點下，*Cdk15* 基因剔除小鼠與野生型小鼠進行統計比較；#, $p < 0.05$, ###, $p < 0.001$, 野生型小鼠打藥後各觀察時間點與 Veh-30 進行統計比較；@, $p < 0.05$, *Cdk15* 基因剔除小鼠打藥後各觀察時間點與 Veh-30 進行統計比較；repeated measure one-way, two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test。

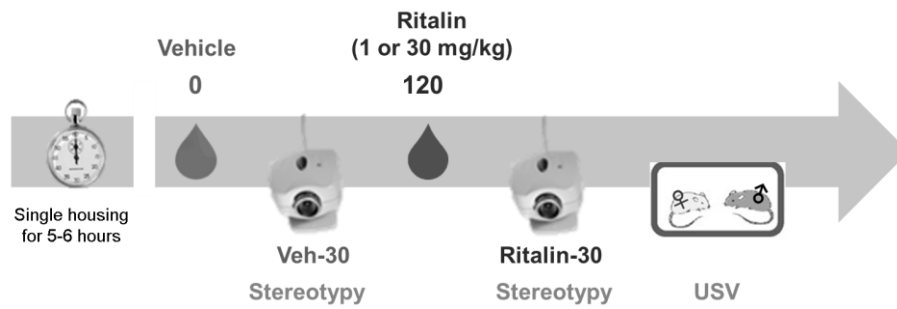


圖十六、*Cdkl5* 基因剔除小鼠投予利他能後長時間之藥物效果。(A) *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型小鼠於皮下注射 1 mg/kg 利他能後兩小時之運動表現。(B) 野生型小鼠於皮下注射 1 mg/kg 或 30 mg/kg 利他能後兩小時之運動表現。(C) *Cdkl5* 基因剔除小鼠於皮下注射 1 mg/kg 或 30 mg/kg 利他能後兩小時之運動表現。Y 軸：敞箱測試中的總移動距離(單位：公分)。圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, 各觀察時間點下進行組間的統計比較；repeated measure two-way ANOVA。(D) 打藥後 30 分至 40 分鐘的總移動距離。Y 軸：敞箱測試中的總移動距離(單位：公分)。柱狀圖皆以平均值 $\pm$ 標準誤差表示。不同基因型與劑量以 two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test 進行統計比較；*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, ns: 無顯著差異。

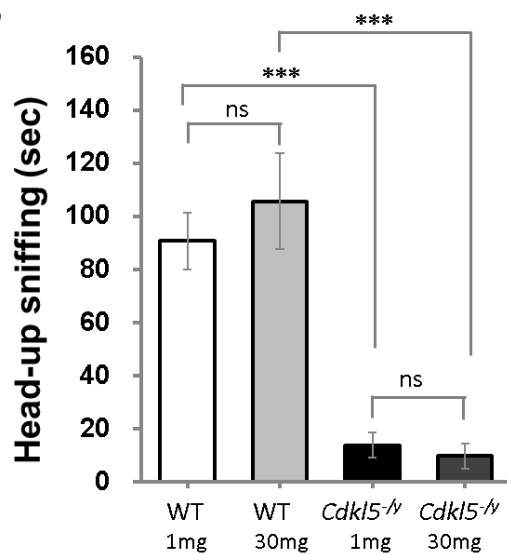


圖十七、*Cdkl5* 基因剔除小鼠投予利他能後改善過動之症狀。(A) 投予利他能測量敞箱活動力之實驗流程圖。(B-D) 野生型小鼠與 *Cdkl5* 突變小鼠施打有效劑量 30mg/kg 與控制組劑量 1mg/kg 利他能 30 分鐘後在敞箱實驗中運動能力之表現。(B) 總移動距離之長條圖 (單位: 公分)。(C) 平均移動速度之長條圖 (單位: 公分/秒)。(D) 最大移動速度之長條圖 (單位: 公分/秒)。不同基因型與劑量以 two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test 進行統計比較; *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$, ns: 無顯著差異。

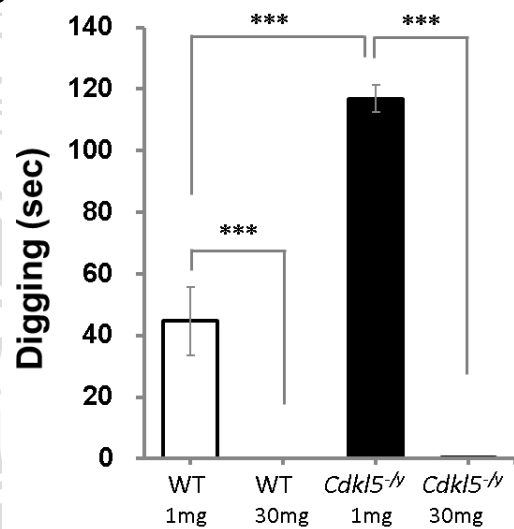
A



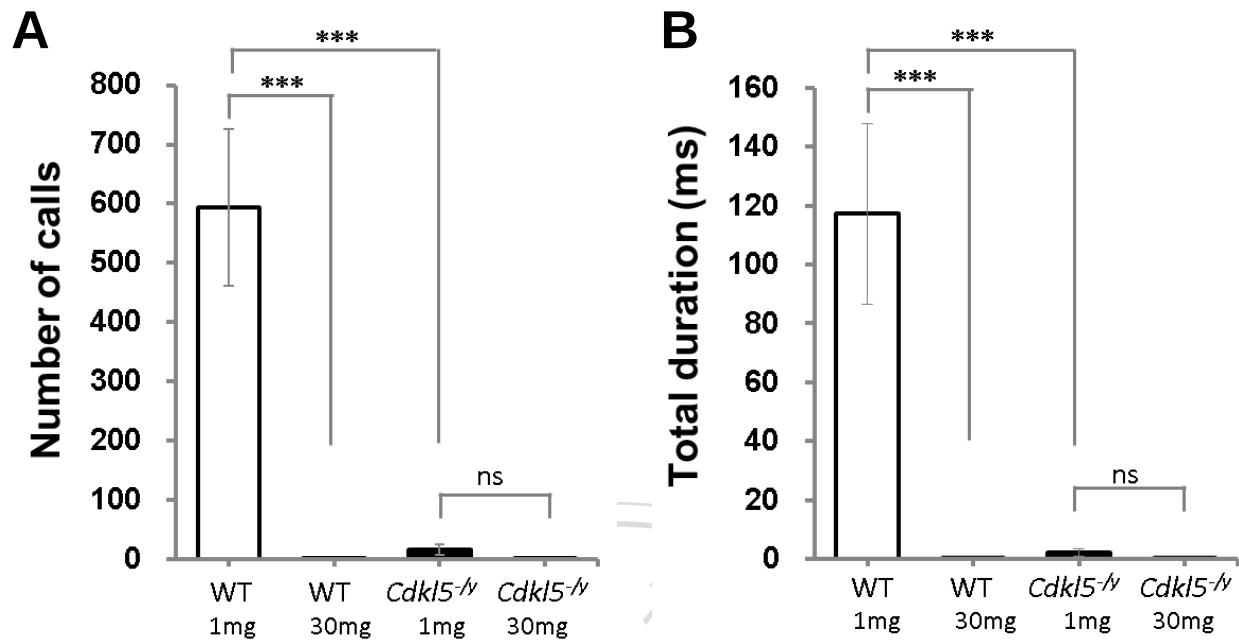
B



C



圖十八、*Cdkl5* 基因剔除小鼠投予利他能後改善其挖掘墊料之刻板行為。(A) 皮下注射投予利他能並測量刻板行為之實驗流程圖。(B, C) 野生型小鼠與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠施打有效劑量 30 mg/kg 與控制組劑量 1 mg/kg 利他能 30 分鐘後在刻板行為之表現。刻板行為觀察之項目包含抬頭嗅聞 (head-up sniffing, B)與挖掘墊料 (digging, C)。(WT_1 mg/kg: n = 7, WT_30mg/kg: n = 8; *Cdkl5*^{-/-}_1 mg/kg: n = 5, *Cdkl5*^{-/-}_30 mg/kg: n = 7)。不同基因型與劑量以 two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test 進行統計比較；***, $p < 0.001$, ns: 無顯著差異。

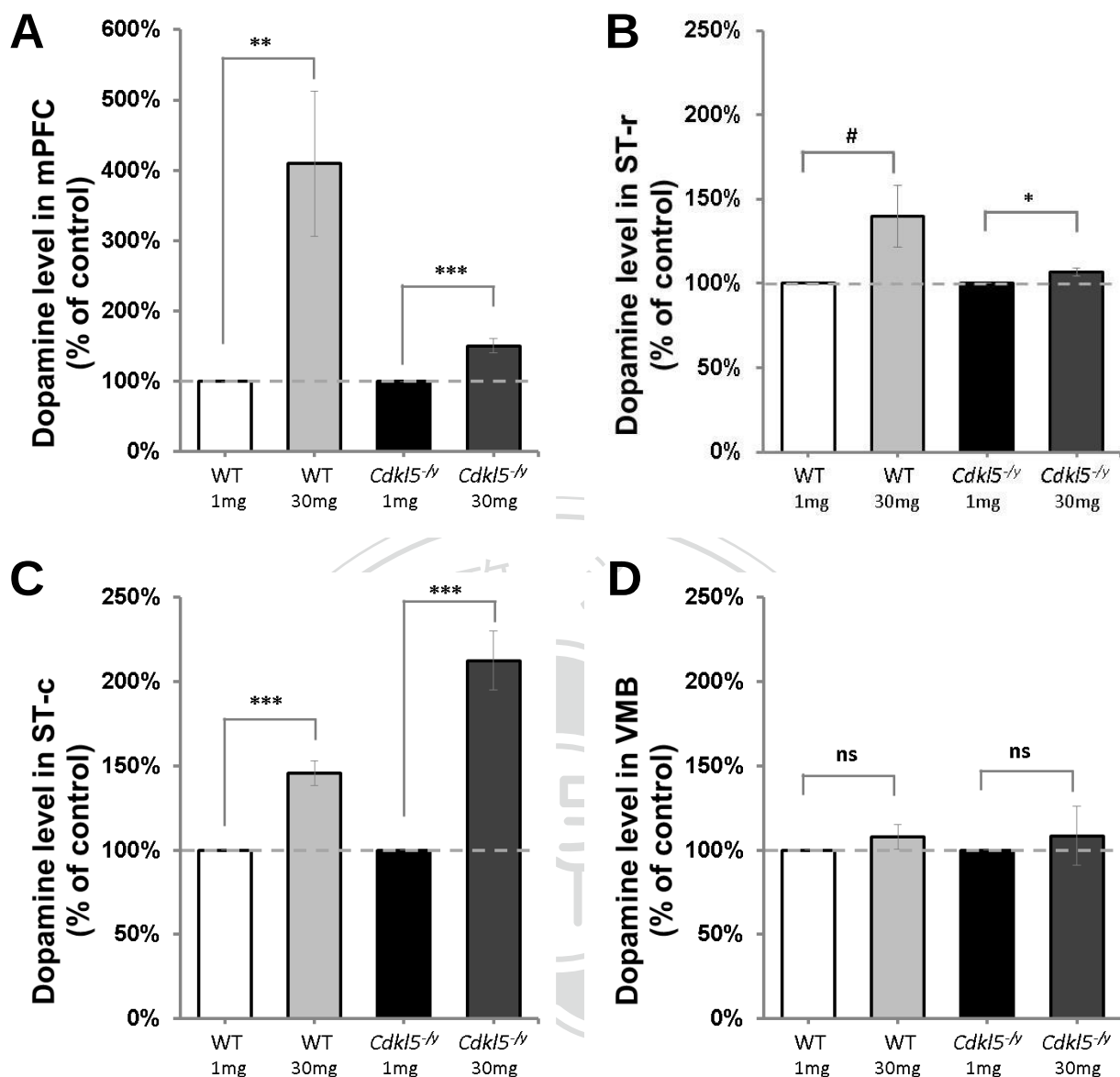


圖十九、*Cdkl5* 基因剔除小鼠投予利他能後無法改善社交溝通之障礙。野生型小鼠與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠於施打有效劑量 30 mg/kg 或控制組劑量 1 mg/kg 利他能 30 分鐘後，記錄母鼠誘發之成鼠超音波鳴叫。(A) 超音波鳴叫總次數之長條圖。(B) 超音波鳴叫總時間之長條圖 (單位：毫秒)。(WT_1 mg/kg: n = 7, WT_30mg/kg: n = 8; *Cdkl5*^{-/-}_1 mg/kg: n = 5, *Cdkl5*^{-/-}_30 mg/kg: n = 7)。不同基因型與劑量以 two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test 進行統計比較；***, $p < 0.001$, ns: 無顯著差異。

第十一節 利他能造成腦中多巴胺之改變

利他能的藥理機制在先前的研究證實主要是與多巴胺轉運子結合，抑制其回收多巴胺的功能(Schweri *et al.*, 1985; Gatley *et al.*, 1996)。相關文獻進一步發現利他能會造成紋狀體中突觸間多巴胺含量的增加 (Kuczenski & Segal, 1997)。而在本研究發現利他能可有效改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動之症狀，因此我們使用 HPLC 檢測投予利他能後野生型小鼠與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的腦中多巴胺含量是否有所的變化。由於本研究的實驗結果發現利他能在運動方面於野生型小鼠與 *Cdkl5* 基因剔除小鼠有截然不同的效果(圖十七)，因此為了瞭解利他能在不同基因型的影響，多巴胺含量的分析方式為個基因型中，有效劑量除以無效劑量之百分比比值(% of control)，進行後續統計分析。

結果發現，無論是野生型小鼠或 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在注射有效劑量後，與無效劑量相比，皆顯著的增加前額皮質 (30 mg/1 mg in WT: $409.39 \pm 103.01 \%$, $p < 0.05$; 30 mg/1 mg in *Cdkl5*^{-/-}: $150.46 \pm 10.24 \%$, $p < 0.01$; one-way ANOVA; $n = 4$, 圖二十 A)、前端紋狀體 (30 mg/1 mg in WT: $139.94 \pm 18.09 \%$, $p < 0.07$; 30 mg/1 mg in *Cdkl5*^{-/-}: $106.61 \pm 2.45 \%$, $p < 0.05$; one-way ANOVA; $n = 4$, 圖二十 B)、後端紋狀體 (30 mg/1 mg in WT: $145.65 \pm 7.29 \%$, $p < 0.001$; 30 mg/1 mg in *Cdkl5*^{-/-}: $212.60 \pm 17.67 \%$, $p < 0.001$; one-way ANOVA; $n = 4$, 圖二十 C)之多巴胺含量，而在中腦腹側區兩者則無明顯改變 (30mg/1mg in WT: $107.86 \pm 20.50 \%$, $p > 0.05$; 30 mg/1 mg in *Cdkl5*^{-/-}: $108.57 \pm 46.67 \%$, $p > 0.05$; one-way ANOVA; $n = 4$, 圖二十 D)。



圖二十、投予利他能後造成腦中多巴胺含量之改變。(A-D) 野生型小鼠與 *Cdk15* 突變小鼠施打有效劑量 30 mg/kg 與控制組劑量 1 mg/kg 利他能 30 分鐘後於前額皮質 (medial prefrontal cortex, mPFC, A)、端紋狀體 (rostral striatum, ST-r, B)、後端紋狀體 (caudal striatum, ST-c, C) 及中腦腹側區 (ventral midbrain, VMB, D) 中多巴胺含量之改變，實驗結果顯示以各基因型公鼠注射控制組劑量 1mg/kg 為比較基準。不同劑量以 one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test 進行統計比較；#, $p < 0.07$, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ 。

第四章 討論

本研究以表面效度、建構效度及預測效度三大方向探討 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的神經化學與行為表型，發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具備類似 ASD 與 ADHD 核心症狀的行為表徵與基因表現之改變。此外，缺少 CDKL5 蛋白下會改變前端腦區多巴胺的合成與代謝；而在投予 ADHD 第一線用藥利他能後，可藉由提升前端腦區的多巴胺含量達到改善部分症狀之效果。因此，*Cdkl5* 基因剔除小鼠可望成為 ASD 與 ADHD 共病之動物模式，並提供未來藥物篩選之平台。

第一節 *Cdkl5* 基因缺失造成大腦多巴胺系統之改變

先前細胞培養研究已證實，CDKL5 蛋白在樹突分支、突觸形成及神經傳導扮演重要的角色(Chen *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013)，而 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的研究更進一步發現，缺少 CDKL5 蛋白除了造成神經元形態發育的缺失，也會影響神經細胞電生理反應 (Amendola *et al.*, 2014)。然而，先前研究都未著墨負責神經元間訊息的傳遞—神經傳遞物質。有鑑於多巴胺系統參與調節機體的各種活動，如：酬賞機制 (Ikemoto, 2007)、動機與學習 (Wise, 2004)、認知能力 (Nieoullon, 2002)、運動控制 (Dunnett & Lelos, 2010)、社會互動 (Burgdorf & Panksepp, 2006)、語言能力 (Dastur *et al.*, 1999) 以及攻擊行為 (Harrison *et al.*, 1997) 等，因此本篇使用 HPLC 測量腦中神經傳遞物質-多巴胺的含量，接著使用西方墨點法分析多巴胺神經元的突觸前/後及多巴胺生成與代謝相關蛋白，希望藉此了解 *Cdkl5* 基因的缺失是否會造成化學突觸的特性改變。

我們發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在前額皮質與前端紋狀體多巴胺含量增加，是由於此二腦區的多巴胺合成酵素 TH 增加以及多巴胺代謝酶 MAOA、MAOB 與 COMT 減少所導致。此外，我們也發現多巴胺轉運子蛋白表現量有顯著增加，可能是由於多巴胺增加而造成多巴胺轉運子補償性的增加。有趣的是，在尾端紋狀體卻是因多巴胺合成酵素 TH 增加以及多巴胺代謝酶 MAOA 與 COMT 的減少造成多巴胺含量增加。綜合以上實驗結果，我們發現缺少 CDKL5 的蛋白下，除了會影響多巴胺系統的合成與代謝，也會

顯著改變突觸前多巴胺轉運子蛋白的表現。由於在多巴胺細胞發源地的中腦腹側區，無論是多巴胺合成酵素、代謝酶與多巴胺含量皆無明顯改變，顯示具有正常製造與分泌多巴胺的能力，但缺少 CDKL5 的蛋白可能造成黑質-紋狀體路徑的神經投射產生區域性的差異（圖二十一 A）。

第二節 *Cdkl5* 基因缺失導致 ASD 相關之行為症狀與基因表現之改變

本篇研究證實了 *Cdkl5* 基因缺失會造成類似 ASD 的三大核心症狀之行為表徵。

首先，在社交障礙之症狀，先前研究發現 DAT1 在 ASD 中扮演了重要角色，在社交焦慮症(social phobia)之病患，發現紋狀體中 DAT1 的密度明顯較控制組少 (Dougherty *et al.*, 1999)；而近期研究從自閉症家族中進行全外顯子定序 (whole-exome sequencing) 發現位於人類 DAT1 基因上的新突變位點，且此突變位點會造成多巴胺系統的失衡(Hamilton *et al.*, 2013)。而在我們的研究中也發現 DAT1 的蛋白表現量在紋狀體有前端增加、後端減少的改變，顯示紋狀體中 DAT1 的缺失可能造成社會互動行為的障礙。

其次，ASD 另一個核心症狀—刻板行為，定義為重覆且不具功能性的肢體動作，在 ASD 的臨床診斷是一個重要指標。雖然關於刻板行為的成因目前無一致的解釋，但多巴胺系統是第一個被證實與刻板行為密切相關的神經傳遞物質。早在 1985 年已發現，使用多巴胺受體的促效劑可使大鼠產生刻板行為 (Szechtman *et al.*, 1985)，後續實驗更進一步證實黑質-紋狀體路徑 (nigrostriatal pathway) 也參與其中 (Langen *et al.*, 2011)。而本篇研究證實 *Cdkl5* 基因缺失會造成多巴胺系統生成與代謝的改變，尤其是黑質-紋狀體路徑中的紋狀體，顯示其可能為 *Cdkl5* 基因缺失小鼠之刻板行為之肇因。除了多巴胺系統可能調控刻板行為產生與否外，許多自閉症候選基因也參與其中，例如：NL1 基因剔除小鼠被報導具有重複性的理毛行為 (grooming)，主要是由於皮質紋狀體(corticostriatal)突觸失去功能，而本研究也在前端皮質發現 NL1 表現量減少之現象，顯示其可能參與 *Cdkl5* 基因缺失小鼠自發性挖掘墊料之刻板行為。

最後，語言溝通障礙是 ASD 中臨床診斷的核心症狀之一。雖然目前研究無法歸

納真正造成語言障礙的成因，但藥理研究發現多巴胺系統參與小鼠超音波叫聲，如 Dastur et al (1999) 研究探討不同的多巴胺受體促效劑會減少幼鼠分離時的超音波鳴叫，但若給予相對應的多巴胺抑制劑卻無法改善此現象，顯示多巴胺系統可能為一參與語言溝通的神經迴路，但其機制仍不明確。

值得注意的是，本研究發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠 FoxP2 的蛋白表現在前端皮質區明顯的增加而尾端紋狀體卻是減少。而 *FoxP2* 基因是在一個擁有語言缺失的英國龐大家族中所發現的突變基因(Hurst et al., 1990)，在不同物種的研究中，皆證實 FoxP2 基因參與語言學習，如：斑胸草雀(zebra finches)和大鼠等。雖然 *FoxP2* 基因廣泛表現於全腦，但研究發現，*FoxP2* 基因的突變的語言障礙患者，常伴隨著紋狀體的功能失衡 (Lai et al., 2003)，顯示紋狀體的 FoxP2 蛋白的表現對語言發展有重大的影響。而本研究也發現缺少 CDKL5 的蛋白下，會造成尾端紋狀體的 FoxP2 蛋白表現量減少，進而影響語言學習；但在另一個負責語言的腦區小腦，則無明顯改變，可能是因為 CDKL5 蛋白主要表現與前端腦區。

綜合上述之探討，本研究中所發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在各腦區中 ASD 相關蛋白的改變可能與 ASD 核心症狀有相對應之關聯(二十一 B)。

第三節 *Cdkl5* 基因缺失導致 ADHD 相關之行為症狀與基因表現之改變

本研究發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠同時表現 ADHD 之主要症狀，包含：過動、無法抑制衝動而產生攻擊行為，以及認知能力的缺失。

首先，我們發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有較高的攻擊性，而衝動攻擊 (impulsive aggression) 為一複雜的行為表型，並由許多腦區參與其病理機制，如前額葉與理性的衝動控制有關(Davidson et al., 2000)。此外神經傳遞物質也扮演重要的角色，人類或動物模式的研究都發現，低濃度的血清素 (serotonin, 5-HT) 會造成較多的衝動攻擊行為 (Linnoila & Virkkunen, 1992)。在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠有明顯較高的攻擊性，有可能腦中的血清素含量有所改變，有待後續進一步分析。此外，負責代謝正腎上腺素、多巴胺與血清素的單胺氧化酶 (MAO)，也會影響攻擊行為，先前研究發現 MAOA

基因剔除小鼠，因腦中血清素與正腎上腺素的增加，產生較多的攻擊行為 (Cases *et al.*, 1995)。除了血清素參與攻擊行為外，多巴胺是另一個被證實正向調節衝動攻擊的神經傳遞物質，在動物研究證實，多巴胺系統過度活化會導致小鼠產生較高的衝動攻擊性 (Netter & Rammsayer, 1991)。而另一部分研究則發現，血清素會調節多巴胺系統，兩者之間的不平衡也會影響攻擊行為的產生與否 (Seo *et al.*, 2008)。綜合上述，我們在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠觀察到前端紋狀體的 MAOA 蛋白表現量減少以及前額皮質的多巴胺失衡有可能是 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有高攻擊性的成因。

其次，我們發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在認知學習作業中有較差的學習曲線，此行為表型與 ADHD 兒童常具有認知方面的障礙相呼應，而 ADHD 病童的認知障礙，包含：難以維持專注與時間概念較差等。腦中的前額皮質已被證實與認知執行功能息息相關 (Chudasama & Robbins, 2006)，尤其是前額皮質中多巴胺更扮演著重要的角色，動物研究發現，減少恆河猴(rhesus monkey)前額皮質的多巴胺會造成空間認知作業的學習障礙，但若給予多巴胺興奮劑 L-dopa 或 apomorphine 則可改善上述之症狀 (Brozoski *et al.*, 1979)。後續的研究也發現前額皮質的多巴胺受體，如 DRD1, DRD2, DRD4 分別對於認知執行功能具有不同的影響 (Floresco & Magyar, 2006)。而我們在 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的前額皮質也發現多巴胺系統相關分子之變化，包含 TH, pTH-Ser40, DDC, DAT1 的蛋白表現量明顯增加，顯示前額皮質功能異常可能影響 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在認知學習作業之表現。

最後，ADHD 最明顯的症狀即為過動，病童往往活動力過高。而多巴胺不平衡對於運動的影響，已由許多疾病研究中得到證實，例如缺少多巴胺而造成帕金森氏症 (Parkinson's disease)。而 *Cdkl5* 基因剔除小鼠雖然在中腦腹側區的多巴胺含量、合成與代謝酶沒有明顯改變，但在前端紋狀體與前額皮質卻因多巴胺合成酶增加與代謝酶減少而造成整體的多巴胺含量提升，顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有多巴胺系統失衡之現象。此外，DAT1 在過動之症狀也扮演重要的腳色。首先在 ADHD 病人相關研究發現，在 DAT1 的基因上具有多型性(polymorphisms)。而動物研究方面，已有研究發現移除全腦 DAT1 的基因剔除小鼠，具有過動之症狀 (Caron, 1996)。而後續研究更進

一步發現，使用派醋甲酯(methylphenidate) 可以緩解 *DAT1* 基因剔除小鼠的過動症狀 (Gainetdinov et al., 1999)。而本研究也發現缺少 *CDKL5* 蛋白會造成多巴胺失衡，且改變 *DAT1* 於紋狀體的蛋白表現量，上述之分子改變可能為過動症狀之成因，而派醋甲酯(methylphenidate)極有可能改善其症狀。

綜合上述之討論，本研究中所發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠在各腦區中 ADHD 相關蛋白的改變可能與 ADHD 核心症狀有相對應之關聯(二十一 C)。

第四節 利他能治療效果之探討

目前用於治療 ADHD 的第一線藥物利他能，主要可改善病童的衝動、過動以及注意力不易集中之症狀。利他能作用在 *DAT1* 上，抑制其回收突觸間之多巴胺，因此會造成突觸間的多巴胺濃度大量提升。本研究最後使用利他能做為治療藥物，我們發現在 30mg/kg 劑量下，可以有效的降低 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之過動及重複性刻板行為，並造成前額皮質、前端紋狀體與後端紋狀體的多巴胺含量增加。

首先，在以利他能治療過動行為之實驗結果，與先前 ADHD 動物模式的結果相符 (Gainetdinov et al., 1999)，於有效劑量時可以明顯改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動現象，並造成多巴胺含量的改變(圖二十)。無論是野生型小鼠或 *Cdkl5* 基因剔除小鼠，利他能皆可顯著增加前額皮質中之多巴胺含量，而 *Cdkl5* 基因剔除小鼠增加的比率少於野生型小鼠，其原因可能是在未給予藥物下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠前額皮質的多巴胺含量比野生型小鼠高所致。而在紋狀體中，利他能也造成多巴胺的增加 (圖二十)，與先前的研究相符 (Hurd & Ungerstedt, 1989; Butcher et al., 1991; Kuczenski & Segal, 1997; Gerasimov et al., 2000)。

核磁共振造影研究發現，ADHD 病童相較於同年紀控制組，在執行與注意力相關的反應/不反應實驗(go/no-go task)中，腦中紋狀體的活性較低。而給予利他能後，增加 ADHD 的病童此腦區之活性，並在抑制反應的作業中有明顯進步 (Vaidya et al., 1998)。而本研究發現未給予藥物下，*Cdkl5* 基因剔除小鼠後端紋狀體多巴胺含量較低 (圖七)，但給予利他能後，造成後端紋狀體多巴胺含量的增加 (圖二十 C)，並伴隨著

部分症狀之改善，因此我們推論利他能的藥效可能主要作用在後端紋狀體，使 *Cdkl5* 基因剔除小鼠原本於後端紋狀體較低下的多巴胺含量因利他能藥物效果而提升，進而達到治療之效果。

最後，本研究是第一個探討利他能在 ASD 重複性刻板行為的治療效果，發現可以有效降低 *Cdkl5* 基因剔除小鼠自發性的挖掘墊料行為。雖然可以改善刻板行為，但無法改善 ASD 其餘兩大核心症狀-語言溝通障礙與社交能力（實驗結果未放入本研究中）。其他文獻指出低劑量之安非他命可以誘發超音波鳴叫聲(Wang et al., 2008)，而本研究使用的利他能濃度較高，若想探討心理興奮劑對語言障礙的治療效果可能需要嘗試較低之劑量。

第五節 *Cdkl5* 基因剔除小鼠可能為 ASD 與 ADHD 共病之模式小鼠

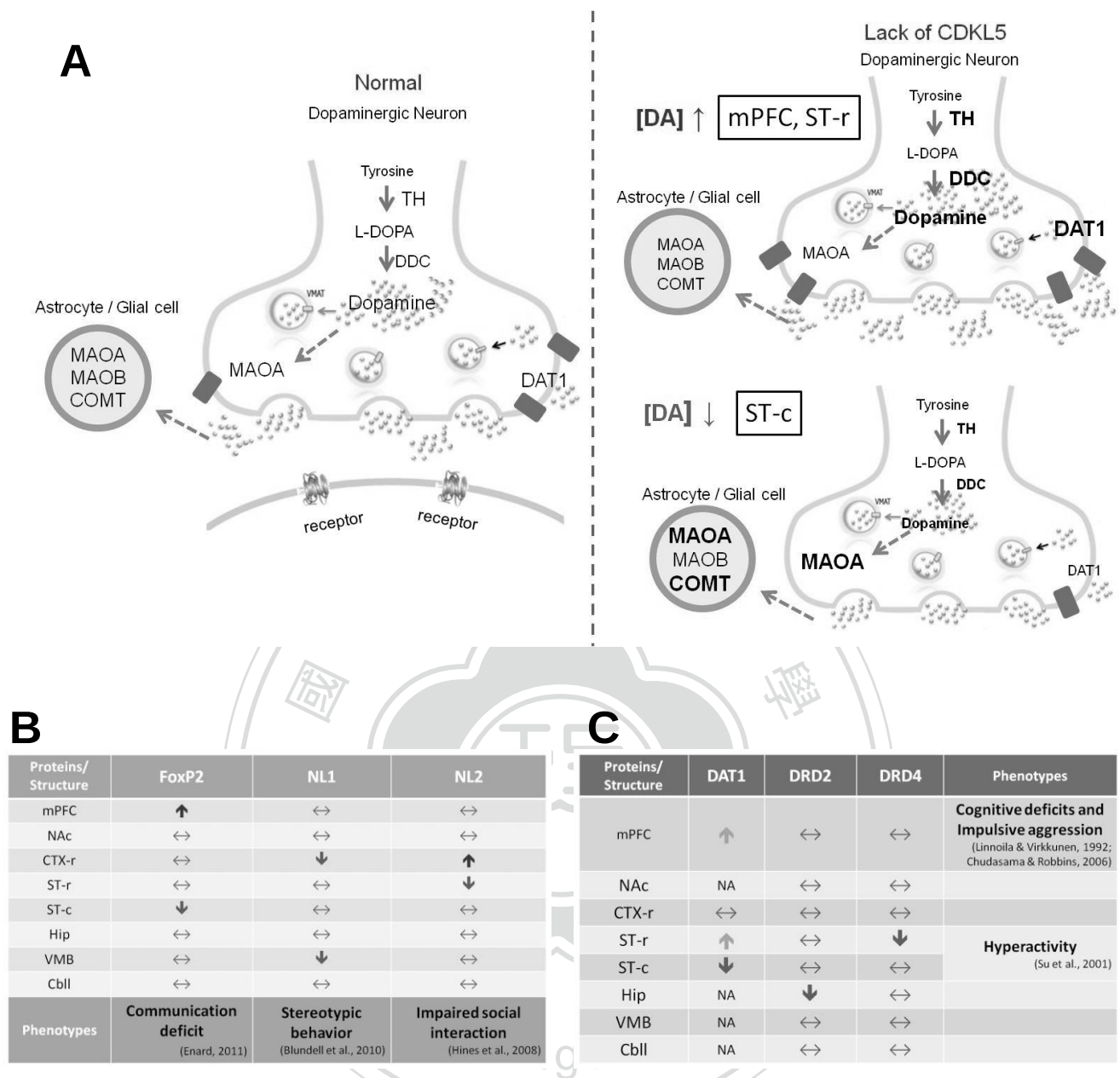
本研究首先進行 *Cdkl5* 基因剔除小鼠的行為表型分析，發現在社會互動上有所缺失(圖一)，與先前研究一致 (Wang et al., 2012)，但先前文獻卻未深入探討 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否具有 ASD 其他核心症狀，因此我們進一步分析，發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠表現較多自發性的刻板行為（即在未給予任何藥物下，便表現出較多的挖掘墊料之行為，圖二），且在語言溝通也有所缺失(即當遇到母鼠時，比野生型公鼠發出較少的超音波鳴叫聲，圖三)。綜合上述，本研究顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之行為表徵符合 ASD 臨床上的三大核心症狀。

先前研究發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有運動能力過多的現象 (Wang et al., 2012)，這部分也與本研究相同(圖四)。但值得注意的是，在 ASD 中接近八成的病童會與其他心理疾患共病，其中又以 ADHD 為主，而 *Cdkl5* 基因剔除小鼠同時具有過動之行為表現，因此我們進一步分析 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否具有 ADHD 其他症狀。我們發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有較高的攻擊性(圖五)，代表在衝動抑制上可能有所缺失。此外，在認知能力相關實驗也發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠有較差的空間學習能力(圖六)。由於認知與學習皆需注意力的參與，因此 *Cdkl5* 基因剔除小鼠可能具有注意力功能的缺損。近年來廣泛用於評估齧齒類注意力表現的五擇一序列反應時程作業

(5-choice serial reaction time task) ，可用來進一步確認 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否有注意力缺損的行為表徵。而在本研究的最後使用目前治療 ADHD 第一線藥物利他能於 *Cdkl5* 基因剔除小鼠，發現可以有效的治療過動之症狀。

總結上述之探討，在表面效度中，*Cdkl5* 基因剔除小鼠同時具有 ASD 與 ADHD 臨床症狀；而建構效度方面，缺少 CDKL5 蛋白下，則會造成 ASD 與 ADHD 相關蛋白的表現量隨腦區而有不同程度的改變；最後在預測效度面向上，我們發現了利他能可以有效改善其過動與刻板行為之症狀，顯示 *Cdkl5* 基因剔除小鼠可望成為一個研究 ASD 共病 ADHD 的動物模式。





圖二十一、CDKL5 蛋白對多巴胺神經元之影響及 *Cdkl5* 基因剔除小鼠腦中 ASD, ADHD 相關蛋白改變與症狀之對應。(A) 缺少 CDKL5 蛋白對多巴胺系統之影響。左圖為野生型小鼠多巴胺神經元合成與代謝之示意圖，右上圖則為前額皮質與前端紋狀體缺少 CDKL5 蛋白情況下，會增加 TH, DDC 的蛋白表現量但減少 MAOA, MAOB, COMT 的蛋白表現量，進而造成多巴胺含量提升。此外位於突觸前的 DAT1 的蛋白表現也有明顯增加，可能為了回收突觸間過多的多巴胺；相反地，尾端紋狀體缺少 CDKL5 蛋白質情況下，會減少 TH, DDC 的蛋白表現量卻增加 MAOA, MAOB, COMT 的蛋白表現量，進而造成多巴胺含量降低，而 DAT1 則代償性的減少蛋白表現。(B) 本圖總結 *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型相比在不同腦區中 ASD 相關蛋白 FoxP2, NL1, NL2 的改變與行為症狀之關連。(C) 本圖總結 *Cdkl5* 基因剔除小鼠與野生型相比在不同腦區中 ADHD 相關蛋白 DAT1, DRD2, DRD4 的改變與行為症狀之關連。

第五章 結論

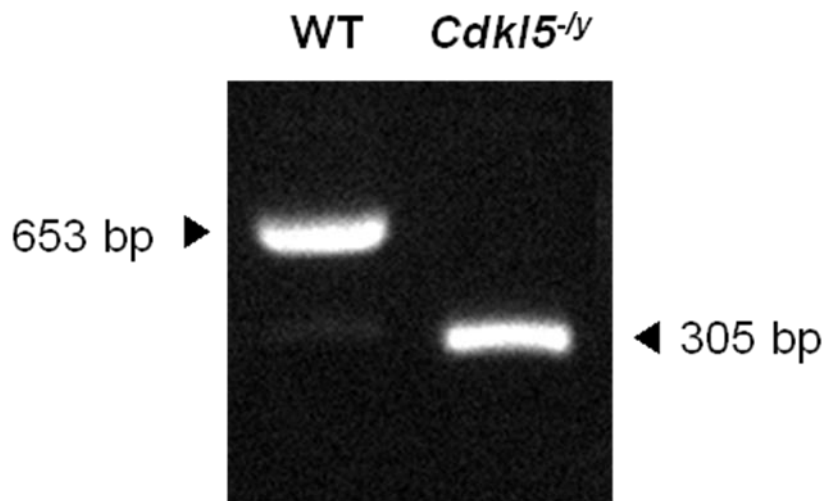
本篇研究以第五型類細胞週期蛋白依賴激酶 (cyclin-dependent kinase-like 5, CDKL5) 基因剔除小鼠為研究基礎，以表面效度 (face validity)、建構效度 (construct validity) 及預測效度 (predictive validity) 三大效度為研究方向，探討 *Cdkl5* 基因剔除小鼠是否可以作為泛自閉症障礙 (autism spectrum disorders, ASD) 與注意力不足過動症 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 的動物模式。

首先，本研究發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠具有 ASD 臨床診斷三大症狀-社會互動缺失、表現重複性的刻板行為和語言溝通障礙，此外大腦中與 ASD 相關蛋白如 Neuroligin1 (NL1)、Neuroligin2 (NL2) 與 Forkhead box protein P2 (FoxP2) 也在不同腦區中有所改變。

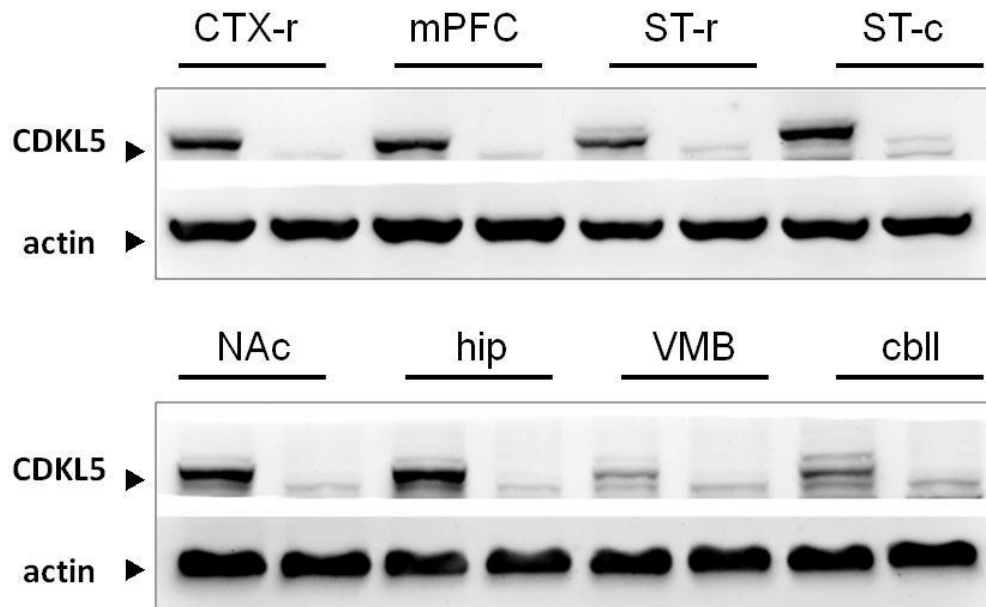
除此之外，本研究也發現 *Cdkl5* 基因剔除小鼠同時具有 ADHD 的部分症狀，其中包含運動能力過高、衝動性攻擊行為與認知學習能力缺失，同時我們也在 ADHD 致病原因之一的多巴胺系統上發現前端腦區的含量與合成的改變，而在與注意力不足過動症相關蛋白質如 Dopamine transporter (DAT1)、Dopamine D2 Receptor (DRD2) 和 Dopamine D4 Receptor (DRD4) 在特定腦區中發現有明顯差異。最後，本研究發現使用目前治療 ADHD 的臨床用藥利他能可以有效改善 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之過動以及刻板行為症狀。

綜言之，本研究之實驗結果提供了以下三點結論：

1. 缺少 CDKL5 蛋白會導致過動與自閉症狀，並影響前額皮質與紋狀體的多巴胺含量、合成酶與代謝酶蛋白之表現。
2. 利他能除了可以有效治療 *Cdkl5* 基因剔除小鼠過動症狀，也可改善重複性挖掘墊料之刻板行為。
3. *Cdkl5* 基因剔除小鼠為一具有表面效度、建構效度及預測效度的動物模式，可用於探討 ASD 與 ADHD 共病的機制，並成為篩選藥物的平台。



附錄一、*Cdkl5* 基因剔除小鼠之基因型鑑定。圖為 *Cdkl5* 基因剔除小鼠之凝膠電泳圖，左側為野生型小鼠，右側為基因剔除小鼠。



附錄二、*Cdkl5* 基因剔除小鼠在大腦缺少 CDKL5 蛋白。上圖為使用西方點墨法檢測大腦各區 CDKL5 蛋白之表現，各腦區中，左側為野生型小鼠，右側為 *Cdkl5* 基因剔除小鼠。CTX-r, 前端皮質 (rostral cortex); mPFC, 前額皮質 (medial prefrontal cortex); ST-r, 前端紋狀體 (rostral striatum); ST-c, 後端紋狀體 (caudal striatum); NAc, 阿控伯氏核 (nucleus accumbens); Hip, 海馬迴 (hippocampus); VMB, 中腦腹側區 (ventral midbrain); Cbll, 小腦 (cerebellum)

參考文獻

- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Washington, DC
- Amara, S.G. & Kuhar, M.J. (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annual review of neuroscience*, **16**, 73-93.
- Amendola, E., Zhan, Y., Mattucci, C., Castroflorio, E., Calcagno, E., Fuchs, C., Lonetti, G., Silingardi, D., Vyssotski, A.L. & Farley, D. (2014) Mapping Pathological Phenotypes in a Mouse Model of CDKL5 Disorder. *PloS one*, **9**, e91613.
- Applegate, B., Lahey, B.B., Hart, E.L., Biederman, J., Hynd, G.W., Barkley, R.A., Ollendick, T., Frick, P.J., GREENHILL, L. & McBurnett, K. (1997) Validity of the age-of-onset criterion for ADHD: a report from the DSM-IV field trials. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, **36**, 1211-1221.
- Avale, M., Falzone, T., Gelman, D., Low, M., Grandy, D. & Rubinstein, M. (2003) The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry*, **9**, 718-726.
- Avale, M., Falzone, T., Gelman, D., Low, M., Grandy, D. & Rubinstein, M. (2004) The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry*, **9**, 718-726.
- Bahi-Buisson, N., Nectoux, J., Rosas-Vargas, H., Milh, M., Boddaert, N., Girard, B., Cances, C., Ville, D., Afenjar, A. & Rio, M. (2008) Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain*, **131**, 2647-2661.
- Barnes, C.A. (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, **93**, 74.
- Blundell, J., Blaiss, C.A., Etherton, M.R., Espinosa, F., Tabuchi, K., Walz, C., Bolliger, M.F., Südhof, T.C. & Powell, C.M. (2010) Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *The Journal of Neuroscience*, **30**, 2115-2129.
- Botchin, M.B., Kaplan, J.R., Manuck, S.B. & Mann, J.J. (1993) Low versus high prolactin responders to fenfluramine challenge: marker of behavioral differences in adult male cynomolgus macaques. *Neuropsychopharmacology*, **9**, 93-99.

- Brozoski, T.J., Brown, R.M., Rosvold, H. & Goldman, P.S. (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, **205**, 929-932.
- Burgdorf, J. & Panksepp, J. (2006) The neurobiology of positive emotions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **30**, 173-187.
- Butcher, S., Liptrot, J. & Aburthnott, G. (1991) Characterisation of methylphenidate and nomifensine induced dopamine release in rat striatum using in vivo brain microdialysis. *Neuroscience letters*, **122**, 245-248.
- Caron, M.G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**, 15.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C. & Shih, J.C. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science (New York, NY)*, **268**, 1763.
- Castellanos, F.X., Lee, P.P., Sharp, W., Jeffries, N.O., Greenstein, D.K., Clasen, L.S., Blumenthal, J.D., James, R.S., Ebens, C.L. & Walter, J.M. (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Jama*, **288**, 1740-1748.
- Chahrour, M. & Zoghbi, H.Y. (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, **56**, 422-437.
- Chen, Q., Zhu, Y.-C., Yu, J., Miao, S., Zheng, J., Xu, L., Zhou, Y., Li, D., Zhang, C. & Tao, J. (2010) CDKL5, a protein associated with Rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling. *The Journal of Neuroscience*, **30**, 12777-12786.
- Chubykin, A.A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P. & Südhof, T.C. (2005) Dissection of synapse induction by neuroligins effect of a neuroligin mutation associated with autism. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 22365-22374.
- Chudasama, Y. & Robbins, T. (2006) Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biological psychology*, **73**, 19-38.

- Costantini, F. & D'Amato, F.R. (2006) Ultrasonic vocalizations in mice and rats: social contexts and functions. *Acta Zoologica Sinica*, **52**, 619-633.
- Dastur, F.N., McGregor, I.S. & Brown, R.E. (1999) Dopaminergic modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. *European journal of pharmacology*, **382**, 53-67.
- Davidson, R.J., Putnam, K.M. & Larson, C.L. (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence. *Science*, **289**, 591-594.
- Dougherty, D.D., Bonab, A.A., Spencer, T.J., Rauch, S.L., Madras, B.K. & Fischman, A.J. (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *The Lancet*, **354**, 2132-2133.
- Dunnett, S.B. & Lelos, M. (2010) Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Progress in brain research*, **184**, 35-51.
- Enard, W. (2011) FOXP2 and the role of cortico-basal ganglia circuits in speech and language evolution. *Current opinion in neurobiology*, **21**, 415-424.
- Faraone, S. & Biederman, J. (2002) Pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress* (Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 577-596.
- Floresco, S.B. & Magyar, O. (2006) Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology*, **188**, 567-585.
- Folstein, S.E. & Rosen-Sheidley, B. (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 943-955.
- Fombonne, E. (2004) Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *The Journal of clinical psychiatry*, **66**, 3-8.
- Fujita, E., Tanabe, Y., Shiota, A., Ueda, M., Suwa, K., Momoi, M.Y. & Momoi, T. (2008) Ultrasonic vocalization impairment of Foxp2 (R552H) knockin mice related to speech-language disorder and abnormality of Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 3117-3122.
- Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Levin, E.D., Jaber, M. & Caron, M.G. (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*,

283, 397-401.

- Gatley, S.J., Pan, D., Chen, R., Chaturvedi, G. & Ding, Y.-S. (1996) Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life sciences*, **58**, PL231-PL239.
- Gerasimov, M.R., Franceschi, M., Volkow, N.D., Gifford, A., Gatley, S.J., Marsteller, D., Molina, P.E. & Dewey, S.L. (2000) Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: a microdialysis and locomotor activity study. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 51-57.
- Gumulka, W., Samanin, R., Garattini, S. & Valzelli, L. (1969) Effect of stimulation of midbrain raphe on serotonin (5-HT) level and turnover in different areas of rat brain. *European journal of pharmacology*, **8**, 380-384.
- Hamilton, P.J., Campbell, N.G., Sharma, S., Erreger, K., Hansen, F.H., Saunders, C., Belovich, A.N., Daly, M., Gibbs, R. & Boerwinkle, E. (2013) De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder. *Molecular psychiatry*, **18**, 1315-1323.
- Harrison, A.A., Everitt, B.J. & Robbins, T.W. (1997) Central 5-HT depletion enhances impulsive responding without affecting the accuracy of attentional performance: interactions with dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology*, **133**, 329-342.
- Higley, J., Hasert, M., Suomi, S. & Linnoila, M. (1998) The serotonin reuptake inhibitor sertraline reduces excessive alcohol consumption in nonhuman primates: effect of stress. *Neuropsychopharmacology*, **18**, 431-443.
- Hurd, Y.L. & Ungerstedt, U. (1989) In vivo neurochemical profile of dopamine uptake inhibitors and releasers in rat caudate-putamen. *European journal of pharmacology*, **166**, 251-260.
- Hurst, J.A., Baraitser, M., Auger, E., Graham, F. & Norell, S. (1990) An extended family with a dominantly inherited speech disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*, **32**, 352-355.
- Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain research reviews*, **56**, 27-78.

- Jaber, M., Dumartin, B., Sagné, C., Haycock, J.W., Roubert, C., Giros, B., Bloch, B. & Caron, M.G. (1999) Differential regulation of tyrosine hydroxylase in the basal ganglia of mice lacking the dopamine transporter. *European Journal of Neuroscience*, **11**, 3499-3511.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M. & Gillberg, C. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature genetics*, **34**, 27-29.
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoquaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A. & Winter, D. (2008) Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 1710-1715.
- Kalscheuer, V.M., Tao, J., Donnelly, A., Hollway, G., Schwinger, E., Kübart, S., Menzel, C., Hoeltzenbein, M., Tommerup, N. & Eyre, H. (2003) Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*, **72**, 1401-1411.
- Kaplan, J.R., Fontenot, M.B., Berard, J., Manuck, S.B. & Mann, J.J. (1995) Delayed dispersal and elevated monoaminergic activity in free-ranging rhesus monkeys. *American Journal of Primatology*, **35**, 229-234.
- Kogan, M.D., Blumberg, S.J., Schieve, L.A., Boyle, C.A., Perrin, J.M., Ghandour, R.M., Singh, G.K., Strickland, B.B., Trevathan, E. & van Dyck, P.C. (2009) Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics*, **124**, 1395-1403.
- Kramer, U., Chi, C.S., Lin, K.L., Specchio, N., Sahin, M., Olson, H., Nabbout, R., Kluger, G., Lin, J.J. & van Baalen, A. (2011) Febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): Pathogenesis, treatment, and outcome. *Epilepsia*, **52**, 1956-1965.
- Krause, K.-H., Dresel, S.H., Krause, J., Kung, H.F. & Tatsch, K. (2000) Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neuroscience letters*, **285**, 107-110.
- Kuczenski, R. & Segal, D.S. (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *Journal of neurochemistry*, **68**, 2032-2037.

- Kuczenski, R., Segal, D.S. & Aizenstein, M. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *The Journal of neuroscience*, **11**, 2703-2712.
- Lai, C.S., Fisher, S.E., Hurst, J.A., Vargha-Khadem, F. & Monaco, A.P. (2001) A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, **413**, 519-523.
- Lai, C.S., Gerrelli, D., Monaco, A.P., Fisher, S.E. & Copp, A.J. (2003) FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain*, **126**, 2455-2462.
- Langen, M., Kas, M.J., Staal, W.G., van Engeland, H. & Durston, S. (2011) The neurobiology of repetitive behavior: of mice.... *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **35**, 345-355.
- Liao, W.-L., Tsai, H.-C., Wang, H.-F., Chang, J., Lu, K.-M., Wu, H.-L., Lee, Y.-C., Tsai, T.-F., Takahashi, H. & Wagner, M. (2008) Modular patterning of structure and function of the striatum by retinoid receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 6765-6770.
- Linnoila, V.M. & Virkkunen, M. (1992) Aggression, suicidality, and serotonin. *Journal of Clinical Psychiatry*.
- McFadyen, M.P., Brown, R.E. & Carrey, N. (2002) Subchronic methylphenidate administration has no effect on locomotion, emotional behavior, or water maze learning in prepubertal mice. *Developmental psychobiology*, **41**, 123-132.
- Montini, E., Andolfi, G., Caruso, A., Buchner, G., Walpole, S.M., Mariani, M., Consalez, G., Trump, D., Ballabio, A. & Franco, B. (1998) Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics*, **51**, 427-433.
- Moy, S., Nadler, J., Perez, A., Barbaro, R., Johns, J., Magnuson, T., Piven, J. & Crawley, J. (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, **3**, 287-302.
- Nestler, E.J. & Hyman, S.E. (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, **13**, 1161-1169.
- Netter, P. & Rammsayer, T. (1991) Reactivity to dopaminergic drugs and aggression related

- personality traits. *Personality and Individual Differences*, **12**, 1009-1017.
- Nieoullon, A. (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in neurobiology*, **67**, 53-83.
- Noaín, D., Avale, M.E., Wedemeyer, C., Calvo, D., Peper, M. & Rubinstein, M. (2006) Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, **24**, 2429-2438.
- Portfors, C.V. (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **46**, 28-34.
- Potter, P., Wolf, L., Boxerman, S., Grayson, D., Sledge, J., Dunagan, C. & Evanoff, B. (2005) Understanding the cognitive work of nursing in the acute care environment. *Journal of Nursing Administration*, **35**, 327-335.
- Rao, P.A. & Landa, R.J. (2013) Association between severity of behavioral phenotype and comorbid attention deficit hyperactivity disorder symptoms in children with autism spectrum disorders. *Autism*, 1362361312470494.
- Raymond, L., Diebold, B., Leroux, C., Maurey, H., Drouin-Garraud, V., Delahaye, A., Dulac, O., Metreau, J., Melikishvili, G. & Toutain, A. (2013) Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the *CDKL5* gene: Identification of novel mutations. *Gene*, **512**, 70-75.
- Rhodes, J. & Garland Jr, T. (2003) Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology*, **167**, 242-250.
- Rhodes, J.S., van Praag, H., Jeffrey, S., Girard, I., Mitchell, G.S., Garland Jr, T. & Gage, F.H. (2003) Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behavioral neuroscience*, **117**, 1006.
- Robinson, T.E. & Camp, D.M. (1990) Does amphetamine preferentially increase the extracellular concentration of dopamine in the mesolimbic system of freely moving rats? *Neuropsychopharmacology*.
- Rubenstein, J. & Merzenich, M. (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition

in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, **2**, 255-267.

Rubenstein, J.L. (2010) Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Current opinion in neurology*, **23**, 118-123.

Rubia, K. (2002) The dynamic approach to neurodevelopmental psychiatric disorders: use of fMRI combined with neuropsychology to elucidate the dynamics of psychiatric disorders, exemplified in ADHD and schizophrenia. *Behavioural brain research*, **130**, 47-56.

Rusconi, L., Salvatoni, L., Giudici, L., Bertani, I., Kilstrup-Nielsen, C., Broccoli, V. & Landsberger, N. (2008) CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *Journal of biological chemistry*, **283**, 30101-30111.

Russell, V., de Villiers, A., Sagvolden, T., Lamm, M. & Taljaard, J. (1995) Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Brain Research*, **676**, 343-351.

Sakai, Y., Shaw, C.A., Dawson, B.C., Dugas, D.V., Al-Mohtaseb, Z., Hill, D.E. & Zoghbi, H.Y. (2011) Protein interactome reveals converging molecular pathways among autism disorders. *Science translational medicine*, **3**, 86ra49-86ra49.

Scattoni, M.L., Crawley, J. & Ricceri, L. (2009) Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **33**, 508-515.

Scattoni, M.L., Ricceri, L. & Crawley, J.N. (2011) Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+ tf/J mice during three types of social encounters. *Genes, Brain and Behavior*, **10**, 44-56.

Schweri, M.M., Skolnick, P., Rafferty, M.F., Rice, K.C., Janowsky, A.J. & Paul, S.M. (1985) [3H] Threo-(±)-Methylphenidate Binding to 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine Uptake Sites in Corpus Striatum: Correlation with the Stimulant Properties of Ritalinic Acid Esters. *Journal of neurochemistry*, **45**, 1062-1070.

Sekiguchi, M., Katayama, S., Hatano, N., Shigeri, Y., Sueyoshi, N. & Kameshita, I. (2013) Identification of amphiphysin 1 as an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorder. *Archives of biochemistry and*

biophysics, **535**, 257-267.

- Seo, D., Patrick, C.J. & Kennealy, P.J. (2008) Role of serotonin and dopamine system interactions in the neurobiology of impulsive aggression and its comorbidity with other clinical disorders. *Aggression and violent behavior*, **13**, 383-395.
- Sharp, T., Zetterström, T., Ljungberg, T. & Ungerstedt, U. (1987) A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain research*, **401**, 322-330.
- Song, J.-Y., Ichtchenko, K., Südhof, T.C. & Brose, N. (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 1100-1105.
- Staal, W.G., de Krom, M. & de Jonge, M.V. (2012) Brief report: the dopamine-3-receptor gene (DRD3) is associated with specific repetitive behavior in autism spectrum disorder (ASD). *Journal of autism and developmental disorders*, **42**, 885-888.
- Szechtman, H., Ornstein, K., Teitelbaum, P. & Golani, I. (1985) The morphogenesis of stereotyped behavior induced by the dopamine receptor agonist apomorphine in the laboratory rat. *Neuroscience*, **14**, 783-798.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M. & Südhof, T.C. (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *science*, **318**, 71-76.
- Talkowski, M.E., Rosenfeld, J.A., Blumenthal, I., Pillalamarri, V., Chiang, C., Heilbut, A., Ernst, C., Hanscom, C., Rossin, E. & Lindgren, A.M. (2012) Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell*, **149**, 525-537.
- Turjanski, N., Lees, A. & Brooks, D. (1999) Striatal dopaminergic function in restless legs syndrome 18F-dopa and 11C-raclopride PET studies. *Neurology*, **52**, 932-932.
- Valli, E., Trazzi, S., Fuchs, C., Erriquez, D., Bartesaghi, R., Perini, G. & Ciani, E. (2012) CDKL5, a novel MYCN-repressed gene, blocks cell cycle and promotes differentiation of neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, **1819**, 1173-1185.

- Varoqueaux, F., Jamain, S. & Brose, N. (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European journal of cell biology*, **83**, 449-456.
- Vattikuti, S. & Chow, C.C. (2010) A computational model for cerebral cortical dysfunction in autism spectrum disorders. *Biological psychiatry*, **67**, 672-678.
- Wang, I.-T.J., Allen, M., Goffin, D., Zhu, X., Fairless, A.H., Brodtkin, E.S., Siegel, S.J., Marsh, E.D., Blendy, J.A. & Zhou, Z. (2012) Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 21516-21521.
- Weaving, L.S., Christodoulou, J., Williamson, S.L., Friend, K.L., McKenzie, O.L., Archer, H., Evans, J., Clarke, A., Pelka, G.J. & Tam, P.P. (2004) Mutations of *CDKL5* Cause a Severe Neurodevelopmental Disorder with Infantile Spasms and Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics*, **75**, 1079-1093.
- Williamson, S.L., Giudici, L., Kilstrup-Nielsen, C., Gold, W., Pelka, G.J., Tam, P.P., Grimm, A., Prodi, D., Landsberger, N. & Christodoulou, J. (2012) A novel transcript of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) has an alternative C-terminus and is the predominant transcript in brain. *Human genetics*, **131**, 187-200.
- Wise, R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews neuroscience*, **5**, 483-494.
- Zametkin, A.J. & Rapoport, J. (1987) Noradrenergic hypothesis of attention deficit disorder with hyperactivity: a critical review. *Psychopharmacology: The third generation of progress*, 837-842.
- Zhu, Y.-C., Li, D., Wang, L., Lu, B., Zheng, J., Zhao, S.-L., Zeng, R. & Xiong, Z.-Q. (2013) Palmitoylation-dependent CDKL5–PSD-95 interaction regulates synaptic targeting of CDKL5 and dendritic spine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 9118-9123.