

國立臺灣師範大學生命科學系 碩士論文

第十七型脊髓小腦運動失調症：
遺傳檢測暨細胞模式之氧化壓力
與細胞毒性研究

**Spinocerebellar ataxia type 17: genetic testing and
oxidative stress and cytotoxicity studies using SCA17
lymphoblastoid and HEK-293 cell models**

研究生：林佩瑛

Pei-Ying Lin

指導教授：李桂楨 博士

Guey-Jen Lee-Chen

中華民國九十七年七月

誌謝

於師大兩年的求學研究生活，過得十分踏實豐富且多采多姿，感謝師大讓我擁有這樣充實的日子與成長的環境。

本篇論文完成，首先要感謝恩師李桂楨老師，您深厚的學養與專業的指導，讓我在研究過程中受益良多，並使我從中獲得成就與肯定，而平時對我的關心與鼓勵，也讓我面臨實驗挫折時，有堅持努力的勇氣；感謝謝秀梅老師，給予研究上的寶貴建議與論文的細心指導，讓我在研究領域中學習進步許多；感謝陳瓊美醫師，提供研究材料，並適時給予指導與建議，讓研究得以順利進行，使論文更臻完善。此外，感謝蘇銘燦老師在研究上提供的協助與建議；感謝黃基礎老師在結果統計方面的指正；也感謝林口長庚紀念醫院、台北榮民總醫院在血液樣本與淋巴細胞株方面的提供。

當然，在師大研究所的求學過程中，也仰賴非常多人的指導與幫忙。感謝實驗室學長姊李姊、玄原學長、秀觀學姊、怡辰學姊、志信學長、士寰學長、慧茹學姊、襄銘學長、郡潔學姊、若芸學姊、霽茹學姊、芷英學姊、雅今學姊，您們在實驗上細心且耐心教導，以及研究上的協助與提醒，都是我學習成長最珍貴的禮物；還有實驗室共同奮鬥的同學們金珏、昇翰、玄竺，學弟妹們品蓉、春嫻、軒浩、國修、郁芳、亦鈞、柏勳.....等，感謝你們平時對我的照顧，常常在我實驗來不及吃午餐時，體貼的幫我買便當，在我實驗低潮時，給予我加油打氣，讓我感受到友誼的溫暖，也因為有你們活潑開朗的個性，互相關懷勉勵，使實驗室充滿和諧歡樂的氣氛，讓我的研究所生活過得愉快又美好。還要感謝鄰近實驗室的夥伴們：政光學長、柏安學長、欣杰學長、芳足學姊、哲維學長、信銘學長、雅津學姊、馨慧學姊、正康學長、莉芳學姊、俊彥、子瑋、明偉、蕙婷、郁涵、世郁.....等，感謝你們在實驗上的指導與藥品器材的協助，以及對我的關懷鼓勵。同時也要感謝室友們逸涵、筱羚、汝黛、湘涵、汝琪，在生活上給予我的照顧與關心，在我研究壓力大時，貼心的寫卡片給我安慰鼓勵，陪我吃飯放鬆心情。更要感謝宜勳一路體貼的陪伴與支持，讓我有信心與勇氣面對一切挑戰。

最後，謹將此篇論文獻給我最愛的家人們：爸爸、媽媽、兩位弟弟、以及在天上的爺爺、奶奶，感謝您們對我的體諒與默默支持，才能讓我無後顧之憂，專心求學研究，謝謝您們！

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
圖表目錄.....	VII
壹、緒論.....	1
一、脊髓小腦運動失調症.....	1
二、第十七型脊髓小腦運動失調症.....	3
三、多麩醯胺酸擴增疾病與氧化壓力.....	5
四、熱休克蛋白.....	6
五、藥物篩檢研究進展.....	8
貳、研究目的.....	10
參、研究材料與方法.....	11
一、 <i>TBP</i> 等位基因之族群遺傳分析.....	11
(一) 血液樣本來源.....	11
(二) 基因組 DNA (Genomic DNA) 萃取.....	11
(三) 聚合酶連鎖反應(PCR)及 <i>TBP</i> 基因型分析(Genotyping)...	12
二、SCA17 病患淋巴細胞株模式.....	13
(一) 細胞來源.....	13

(二) 細胞培養.....	13
(三) 細胞死亡率 - Trypan blue 排除檢測 (Trypan blue exclusion assay)	14
(四) 淋巴細胞株的蛋白質分析.....	14
1. 蛋白質萃取.....	14
2. 西方轉漬法 (Western blotting)	15
三、誘導式 SCA17 細胞模式.....	16
(一) 細胞來源.....	16
(二) 細胞培養.....	16
(三) 不完整 N 端 TBP 重組質體構築.....	17
1. DNA 片段純化.....	17
2. 轉型勝任細胞 (Competent cells) 製備.....	18
3. 接合反應.....	19
4. 細菌轉型作用 (Transformation)	19
5. 質體 DNA 小量製備.....	19
6. 質體 DNA 大量製備.....	20
(四) 誘導式 SCA17 細胞株建立.....	21
(五) 誘導式 SCA17 細胞株的 RNA 分析.....	23
1. RNA 萃取.....	23

2. 反轉錄作用 (Reverse transcription)	24
3. 同步定量 PCR (Real-time PCR).....	24
(六) 誘導式 SCA17 細胞株的蛋白質分析.....	25
(七) 次細胞蛋白質分群(Subcellular protein fractionation)分析...	26
(八) 細胞螢光觀察.....	27
(九) 細胞存活率檢測.....	27
1. WST-1 細胞增生檢測 (WST-1 cell proliferation assay).....	27
2. MTT 細胞增生檢測 (MTT cell proliferation assay)	28
肆、結果.....	30
一、 <i>TBP</i> 等位基因之族群遺傳分析.....	30
二、淋巴細胞株對氧化壓力之耐受性.....	31
三、淋巴細胞株之熱休克蛋白表現.....	33
四、誘導式 SCA17 細胞模式之建立.....	34
五、誘導式 SCA17 細胞模式對藥物之敏感性.....	37
六、誘導式 SCA17 細胞模式之熱休克蛋白表現.....	40
伍、討論.....	42
一、 <i>TBP</i> 等位基因之族群遺傳分析.....	42
二、淋巴細胞株對去血清及氧化壓力之耐受性.....	43

三、淋巴細胞株之熱休克蛋白表現.....	44
四、誘導式 SCA17 細胞模式之建立.....	45
五、誘導式 SCA17 細胞模式對藥物之敏感性.....	47
六、誘導式 SCA17 細胞模式之熱休克蛋白表現.....	48
七、淋巴細胞株與誘導式 SCA17 細胞模式之差異.....	49
陸、參考文獻.....	51
柒、附錄圖表.....	66

摘要

第十七型脊髓小腦運動失調症 (SCA17) 為體染色體顯性遺傳的神經退化性疾病，起因於位在染色體 6q27 位置上的 *TATA-binding protein* (*TBP*) 基因之 CAG/CAA 三核苷酸重複擴增，轉譯出帶有不正常的聚麩醯胺鏈 (polyQ tract) 的蛋白質產物，造成蛋白質構形改變而產生錯誤摺疊與聚集，導致疾病。目前 SCA17 致病機轉尚未完全瞭解，且尚無有效治療方法，加上疾病進程發展及變異極大，因此瞭解 *TBP* 基因 CAG 三核苷酸重複在族群中的分佈情形及探討可能致病機轉，將對發展疾病治療策略有所助益。本論文即以 SCA17 為主題，首先進行臺灣地區正常人族群、帕金森氏症患者族群、原發性顫抖症患者族群與其它神經退化性疾病患者族群的 *TBP* 基因 CAG 三核苷酸重複遺傳分析，發現 CAG/CAA 重複次數的頻率主要集中在 36 個重複序列，並於 OPMD 及 TICS 疾病中發現有兩名不正常擴增的例子 (44 and 45 repeats)，顯示 *TBP* 基因重複擴增序列可能與其它神經疾病相關。另一部分利用年齡與性別配對的 SCA17 淋巴細胞株及建立誘導式 SCA17 細胞模式，檢視氧化壓力與熱休克蛋白在 SCA17 上扮演的角色。氧化劑 TBH 處理後兩種細胞模式皆顯示帶有 polyQ 擴增的細胞對氧化壓力的耐受性顯著差於帶有正常 *TBP* 的細胞，推論氧化壓力可能參與 SCA17 致病機轉。此外，在 SCA17 淋巴細胞株或誘導式 SCA17 細胞模式觀察到 HSPA8 與 HSPB1 表現量的改變，暗示此兩種熱休克蛋白亦可能參與 SCA17 致病機轉。最後，組蛋白去乙醯酶抑制劑 valproate 可增加帶有 polyQ 擴增細胞的存活率的發現，將有利於找出 SCA17 治療策略的目標。

Abstract

Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) is an inherited progressive neurodegenerative disease. It is caused by an expanded polyglutamine (polyQ) tract in the TATA-box binding protein (TBP), a general transcription initiation factor, which is crucial for most gene transcription. The expanded polyQ causes a conformational change leading to protein misfolding and aggregation. However, it remains unclear how the polyQ tract affects cellular protein function and induces selective loss of neurons. In this study, we examined the CAG/CAA repeat size range in *TBP* allele in Taiwanese control subjects and in patients with Parkinson's disease, essential tremor, and other neurological disorders by SCA17 genotyping. The most common *TBP* allele contains 36 repeats and two expanded (44 and 45 repeats) alleles were found in patients with OPMD and TICS. Using age- and gender-matched lymphoblastoid and stably induced HEK-293 cells with expanded polyQ, we examined the roles of oxidative stress and chaperones in the pathogenesis of SCA17. In both cell models the relative cell death ratio in cells expressed expanded TBP is significantly higher than that in cells expressed normal TBP upon prooxidant TBH (tert-butyl hydroperoxide) treatment. The results suggest that oxidative stress may be involved in SCA17 pathogenesis. In addition, altered HSPA8 and HSPB1 expressions were observed in lymphoblastoid model or stably induced HEK-293 model, suggesting that HSPA8 and HSPB1 may be involved in SCA17 pathogenesis. Finally, the finding that treatment of histone deacetylases inhibitor valproate increases the viability of cells expressing expanded TBP may help to identify potential targets of SCA17 therapies.

圖表目錄

圖一、建立誘導式 SCA17 細胞模式流程圖.....	66
圖二、 <i>TBP</i> 等位基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數頻率分布圖...	67
圖三、 <i>TBP</i> 基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數基因型分佈圖.....	68
圖四、淋巴細胞株對血清去除與 TBH 處理之相對細胞死亡率.....	69
圖五、淋巴細胞株之 HSPA5 蛋白表現情形.....	70
圖六、淋巴細胞株之 HSPA5 相對蛋白表現量化圖.....	71
圖七、淋巴細胞株之 HSPA8 與 HSPB1 蛋白表現情形.....	72
圖八、淋巴細胞株之 HSPA8 及 HSPB1 相對蛋白表現量化圖.....	73
圖九、誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q _{3/54} -EGFP 之 mRNA 誘導表現情形.....	74
圖十、誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q _{3/54} -EGFP 蛋白表現 情形.....	75
圖十一、tNTBP-Q ₃ -EGFP 細胞株之融合綠螢光蛋白表現情形.....	76
圖十二、tNTBP-Q ₅₄ -EGFP 細胞株之融合綠螢光蛋白表現情形.....	77
圖十三、誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q _{3/54} -EGFP 蛋白次細胞分 群分析.....	78
圖十四、誘導式 SCA17 細胞處理 STS 與 MG132 之相對細胞 存活率.....	79

圖十五、誘導式 SCA17 細胞處理 TBH 與 VPA 之相對細胞 存活率.....	80
圖十六、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPA5 蛋白表現情形與 量化圖.....	81
圖十七、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPA8 蛋白表現情形與 量化圖.....	82
圖十八、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPB1 蛋白表現情形與 量化圖.....	83
圖十九、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPB1 mRNA 表現情形....	84
表一、正常與 SCA17 淋巴細胞株年齡性別配對與 <i>TBP</i> 等位 基因 CAG/CAA 重複次數.....	85
表二、 <i>TBP</i> 等位基因 CAG/CAA 三核苷重複次數之頻率.....	86
表三、 <i>TBP</i> 等位基因 CAG/CAA 三核苷重複次數擴增之定序結 果.....	87

壹、緒論



一、脊髓小腦運動失調症

脊髓小腦運動失調症 (spinocerebellar ataxias, 簡稱 SCAs) 又俗稱小腦萎縮症, 為一群體染色體顯性遺傳的神經退化性疾病。這類型疾病主要臨床症狀為小腦萎縮退化, 造成行動失調、發音困難等。此外, 患者亦有腦幹、脊髓或週邊神經系統的損傷 (Wullner, 2003)。目前被報導的脊髓小腦運動失調症超過 28 種亞型 (Manto, 2005; Duenas et al., 2006), 各亞型之間臨床症狀相似, 難以藉由病徵來區分, 須進一步作分子層次的檢測與診斷。

脊髓小腦運動失調症依據基因突變的情形可分成三大類, 第一大類為致病基因具有 CAG 三核苷酸重複 (trinucleotide repeat) 擴增所造成的疾病, 包括 SCA1、2、3、6、7、17 及齒狀核紅核殼視丘下核萎縮症 (dentatorubropallidoluysian atrophy, 簡稱 DRPLA) 等 (Orr et al. 1993; Kawaguchi et al. 1994; Koide et al. 1994; Imbert et al. 1996; Pulst et al. 1996; David et al. 1997; Zhuchenko et al. 1997; Koide et al. 1999); 第二大類則由於致病基因在非轉譯區含有三或五核苷酸重複擴增而導致的疾病, 包括 SCA8、10、12 等 (Holmes et al. 1999; Koob et al. 1999; Matsuura et al. 2000); 第三大類則為致病基因發生缺失突

變 (deletion mutation)、錯意突變 (missense mutation)、無意義突變 (nonsense mutation) 或剪接位突變 (splice site mutation) 所造成的疾病，包括 SCA5、14、27 等 (van de Warrenburg et al. 2003; Yabe et al. 2003; Stevanin et al. 2004; Alonso et al. 2005; Brusse et al. 2006; Ikeda et al. 2006)。大部分的脊髓小腦運動失調症屬於第一類 CAG 重複擴增的疾病，這些不同致病基因上 CAG 三核苷酸重複擴增，會轉譯出不正常的聚麩醯胺鏈 (polyglutamine tract，簡稱 polyQ tract) 的蛋白質產物，進而改變蛋白質的構形，導致突變蛋白摺疊錯誤、溶解性降低，而形成聚集 (aggregation)。帶有 polyQ 擴增的突變蛋白在此過程中會與細胞內一些蛋白結合，包括轉錄調節因子 (transcription factor)、熱休克蛋白 (heat shock protein)、26S 蛋白酶體次單元 (proteasome subunits)、監護蛋白 (chaperones) 等，而形成不溶性的包涵體 (inclusion body)，影響細胞正常生理功能，造成神經退化及死亡 (Perze et al., 1998; Mitsui et al., 2002; Schmidt et al., 2002)。

此外，CAG 三核苷酸重複擴增的數目也會影響疾病的發病年齡及臨床症狀，當擴增數目越多時，發病年齡越早且越嚴重 (Duenas et al., 2006)。在遺傳上，也發現有期望效應 (anticipation) 情形，即病患子女之三核苷酸重複擴增的數目會多於父母，導致子女發病年齡提早且症狀更嚴重 (Maltecca et al., 2003; Manto, 2005)。

二、第十七型脊髓小腦運動失調症

第十七型脊髓小腦運動失調症 (SCA17) 為位於染色體 6q27 位置上的 *TATA-binding protein* (*TBP*) 基因上帶有 CAG/CAA 三核苷酸重複擴增而造成疾病 (Koide et al., 1999; Nakamura et al., 2001)。臨床症狀上，除了小腦萎縮外，患者也出現行動失調、肌張力不全、精神疾病、認知功能障礙、失智、亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease, 簡稱 HD) 及帕金森氏症候群 (parkinsonism) 等症狀 (Nakamura et al., 2001; De Michele et al., 2003; Rolfs et al., 2003; Stevanin et al., 2003; Hernandez et al., 2003; Lasek et al., 2006)。

Koide 等學者在 1999 年首先報導，一位 *TBP* 基因上帶有 63 個 CAG/CAA 三核苷酸重複擴增的日本女性，出現有神經退化性病變 (Koide et al., 1999)。之後根據不同族群的遺傳研究顯示，正常人族群中 *TBP* 基因的 CAG/CAA 重複數目約 25 到 42 之間，在家族性及偶發性的運動失調患者 CAG/CAA 重複數目擴增至 43 到 66 之間 (Nakamura et al., 2001; Fujigasaki et al., 2001; Zuhlke et al., 2001; Silveira et al., 2002; Reid et al., 2003; Maltecca et al., 2003)。而臺灣地區的帕金森氏症 (Parkinson's disease, 簡稱 PD)、阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, 簡稱 AD) 及精神分裂症患者族群中，也發

現有 *TBP* 基因的 CAG/CAA 重複序列不正常擴增的例子，顯示 *TBP* 基因的不正常擴增可能亦與多種神經疾病相關（Wu et al., 2004, 2005; Chen et al., 2005）。

正常 *TBP* 基因所轉譯出的 TBP 蛋白為 RNA 聚合酶 II（RNA polymerase II）的轉錄因子 D 之次單元，在細胞轉錄過程中扮演重要角色。當基因進行轉錄前，須藉由 TBP 蛋白來辨識啓動子（promoter）的 TATA box 上的正確位置，進而結合，使 DNA 構形適當改變，幫助其它轉錄因子及 RNA 聚合酶與 DNA 結合，啓動轉錄進行（Burley and Roeder, 1996）。TBP 蛋白的 C 端主要為 DNA 結合的區域，而 N 端則具有調節 C 端與 DNA 結合的功能，SCA17 病人在 *TBP* 基因上的 CAG/CAA 三核苷酸重複擴增，使得 TBP 蛋白的 N 端帶有擴增的 polyQ，而此區域附近也是 TBP 蛋白與其它轉錄因子結合的位置（Seipel et al., 1994），因此 TBP 蛋白的 polyQ 擴增序列有可能會影響某些基因的轉錄效率，使細胞正常生理功能受損，導致敏感的神經細胞產生病變及退化。在 SCA17 轉殖小鼠的研究中顯示，帶有擴增 polyQ 的 TBP 蛋白會加強和轉錄因子 TFIIB 的作用，同時 HSPB1 蛋白表現量受到負向調節，並觀察到 TFIIB 在 *Hspb1* 啓動子上佔據情形有降低的現象，暗示著 TBP 蛋白上帶有 polyQ 的區域在轉錄調節上可能扮演著重要的角

色 (Friedman et al., 2007)。

三、多聚醯胺酸擴增疾病與氧化壓力

三核苷酸 CAG 重複擴增，轉譯出不正常的 polyQ 蛋白質，除造成 SCA17 疾病的發生外，還包含 HD、延髓肌萎縮症 (spinobulbar muscular atrophy, 簡稱 SBMA)、SCA1、2、3、6、7 以及 DRPLA 等神經退化性疾病 (Cummings and Zoghbi, 2000)。雖然這些疾病的致病基因不同，影響不同的神經細胞，但具有相似性病徵，顯示可能有共通的致病機轉。目前研究發現 polyQ 擴增會改變蛋白質的構形，導致突變蛋白摺疊錯誤且形成不溶性的包涵體聚集 (Perutz et al., 1994; DiFiglia et al., 1997)。此外，polyQ 擴增造成的 caspase 活化及細胞凋亡 (apoptosis)、異常受體活化、能量代謝異常、氧化壓力產生、干擾基因轉錄機制等亦與疾病形成有關 (Goldberg et al., 1996; Browne et al., 1997; Cha et al., 1999; Wellington and Hayden, 2000; Okazawa, 2003; Trushina and McMurray, 2007)。

目前研究認為粒腺體 (mitochondria) 功能的損傷與氧化壓力的增加是造成神經退化性疾病，如 PD、AD 及 HD 的危險因子 (Albers and Beal, 2000)。在 HD 的 *in vitro* 和 *in vivo* 實驗中，發現帶有 polyQ 擴增的 huntingtin 突變蛋白會引發氧化壓力的產生 (Browne et al., 1999;

Bogdanov et al., 2001; Wyttenbach et al., 2002), 位於 HD 轉殖小鼠腦中的紋狀體 (striatum) 區域亦顯示有氧化傷害增加的情形 (Perez-Severiano et al., 2000)。而且氧化壓力會促進突變的 huntingtin 蛋白的聚集與誘發細胞的死亡 (Goswami et al., 2006)。另外, 也發現一氧化氮 (NO) 參與氧化傷害形成, 並影響神經退化症狀出現的時間 (Perez-Severiano et al., 2002)。而在麩氨基硫耗盡 (glutathione-depletion-induced) 或過氧化誘發 (peroxide-induced) 氧化壓力的研究中觀察到, 處於氧化壓力的神經細胞, Sp1 乙醯化 (acetylation) 的情形會增加, 顯示 Sp1 的大量表現可幫助細胞對抗氧化壓力與氧化傷害, 使細胞存活。然而, 突變的 huntingtin 蛋白會妨礙 Sp1 和 TAF_{II}130 結合, 影響細胞產生適應氧化壓力的反應 (Ryu et al., 2003)。

四、熱休克蛋白

熱休克蛋白 (heat shock protein, 簡稱 HSP) 為一群蛋白質的總稱, 家族成員包含 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和 18-30 kDa 小分子量的 HSPs 等, 存在於細胞質、粒腺體、內質網及細胞核中 (Kiang and Tsokos, 1998), 是維持細胞生命所必須的蛋白質。在正常細胞生長狀況下, 許多熱休克蛋白具有持續表現量, 扮演監護蛋白的角色, 保護細胞免於傷害, 使其維持正常之生理功能 (Ohtsuka and Hata, 2000)。當細

胞受到各種壓力，包括氧化壓力時，會快速增加熱休克蛋白來幫助細胞抵抗壓力所造成的傷害（Ohtsuka and Hata, 2000; Ohtsuka and Suzuki, 2000）。此外，熱休克蛋白可透過抑制細胞內某些變性蛋白的聚集，並利用能量消耗來幫助細胞內未摺疊、錯誤摺疊或聚集的蛋白質恢復正常結構，維持蛋白質活性。

多麩醯胺酸擴增疾病大多被認為是獲得功能（gain-of-function）的突變，表示擴增的 polyQ 會使蛋白構形不穩定，影響摺疊方式，造成蛋白質摺疊錯誤和傾向聚集，進而導致蛋白質功能異常而具有毒性，累積在細胞質或細胞核內，形成不溶性的聚集物（aggregate）或包涵體，最後使神經細胞受損。此過程中亦發現有 HSPs 參與，於 SCA3 病患腦部與細胞模式研究中，均觀察到 HSP40 與 HSP70 的表現和聚集物位於同一區域（colocalization），顯示兩者密切相關；進一步以細胞模式過度表現 HSP40 可抑制突變蛋白的聚集，意味著擴增的 polyQ 能誘發 HSPs 來反應壓力環境（Chai et al., 1999）。

之後 Kobayashi 和 Sobue 的文獻報導也指出熱休克蛋白對於 polyQ 疾病具有保護作用（Kobayashi and Sobue, 2001）。在 SBMA 的細胞研究中，顯示 HSP70 和 HSP40 結合表現能有效降低突變的致病蛋白聚集與細胞死亡，亦觀察到 SBMA 轉殖小鼠過度表現 HSP70，其損傷的運動功能可獲得改善（Kobayashi et al., 2000; Adachi et al., 2003）。而於

老鼠和果蠅動物模式的研究中，也認為過度表現 HSP70 具有延緩神經功能受損，促進細胞存活和抑制 polyQ 所引起的神經退化的效果 (Warrick et al., 1999; Chan et al., 2000; Cummings et al., 2001)。另外，HSPB1 被報導對於神經細胞的存活具有抗細胞凋亡 (anti-apoptotic) 的性質 (Lewis et al., 1999; Wagstaff et al., 1999)。HD 研究結果發現 HSPB1 能防止細胞內的 polyQ 蛋白的毒性，並可抑制突變的 huntingtin 蛋白所引發的反應性含氧物種 (reactive oxygen species, 簡稱 ROS) 增加，亦證實 HSPB1 能保護細胞對抗氧化壓力的傷害 (Wytenbach et al., 2002)。

五、藥物篩檢研究進展

目前對致病機轉的瞭解已有許多進展，同時在藥物篩檢方面，也陸續報導出許多具有潛能的治療藥物，大致有以下數類：

(一) 降低聚麩醯胺蛋白聚集的藥物。如：geldanamycin、cystamine 等，可增加細胞內熱休克蛋白或監護蛋白的表現，幫助 polyQ 蛋白摺疊及穩定，減緩 polyQ 蛋白聚集 (Sittler et al., 2001; Karpuj et al., 2002; Dedeoglu et al., 2002; Kiang, 2004)。

(二) 增加基因轉錄效率的藥物。如：sodium butyrate、trichostatin (TSA)、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) 等，這些組蛋白

去乙酰酶抑制劑 (histone deacetylases inhibitor , 簡稱 HDACi) , 可使染色體進行乙酰化 , 結構變為較疏鬆 , 以利基因轉錄進行 (Steffan et al., 2001; Ferrante et al., 2003; Hockly et al., 2003) 。此外 , valproate 可透過抑制組蛋白去乙酰酶和誘導熱休克蛋白表現 , 進而產生神經保護的效果 (Ren et al., 2004) 。

(三) 增強粒腺體功能的藥物。如 : creatine 、 coenzyme Q10 、 α -lipoic acid 等可提升細胞能量代謝或增加抗氧化的能力 , 以減緩動作失調症狀 (Beal and Ferrante, 2004) 。

(四) 抑制細胞凋亡的藥物。如 : zVAD-fmk 、 DEVD-fmk 、 taurodeoxycholic acid 、 minocycline 等 , 藉由抑制細胞凋亡的執行酵素 caspase , 來阻斷細胞凋亡路徑 , 減少神經細胞死亡 (Ona et al., 1999; Chen et al., 2000) 。

(五) 其它用於神經性或蛋白質聚集疾病的藥物。如 : Bis-ANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate) (Cordeiro et al., 2004; Ferrao-Gonzales et al., 2005) 、 N-acetylcysteine (Knuckey et al., 1995) 、 rapamycin (sirolimus) (Ravikumar et al., 2002, 2004; Berger et al., 2006) 、 FK506 (tacrolimus) (Gold et al., 2004) 等。

貳、研究目的

本篇研究以 SCA17 為主題，首先在族群遺傳方面，針對臺灣地區正常人族群、帕金森氏症患者族群、原發性顫抖症患者族群與其它神經退化性病患者或家屬族群的 *TBP* 基因進行基因型分析，以瞭解臺灣人族群中 *TBP* 等位基因的 CAG/CAA 三核苷酸重複次數的情形與分布，以及與神經退化性疾病之間的相關性，並提供臺灣地區遺傳資料庫建立所需資料。另一方面，由於多麩醯胺酸擴增疾病詳細致病機轉尚不清楚，仍有待進一步研究；再者，疾病進程發展及變異性極大，目前仍無有效的治療方法，因此探討 SCA17 之致病機轉將對疾病治療有所助益且具重要性。本篇研究即利用淋巴細胞株與建立誘導式 SCA17 細胞模式，處理血清去除、氧化劑、細胞凋亡誘導劑、蛋白酶體抑制劑與 valproate 候選藥物，檢測細胞死亡率或存活率，評估 SCA17 細胞與正常細胞對氧化壓力的耐受性與藥物的敏感性，並瞭解熱休克蛋白 HSP70 家族中的 HSPA5 與 HSPA8，以及 HSPB1 表現情形，探討 SCA17 疾病可能的致病機轉，期能提供藥物篩檢與疾病治療策略上的參考。

參、研究材料與方法



一、*TBP* 等位基因之族群遺傳分析

(一) 血液樣本來源

正常人族群（經醫師診斷無神經退化性疾病），帕金森氏症、原發性顫抖症（essential tremor）及其它神經退化性疾病患者或家屬等血液樣本由林口長庚紀念醫院神經肌肉疾病科吳逸如醫師、陳瓊美醫師提供。血液樣本採集均經本人或家屬同意。

(二) 基因組 DNA（Genomic DNA）萃取

利用市售 DNA Extraction Kit（Cat. No.200600, Stratagene）萃取基因組 DNA，方法如下：血液樣本約 4-6 ml，加入 1X Solution I 至 15 ml，翻轉混合均勻後，靜置於冰上作用 5-10 分鐘。離心 2,000 rpm、5 分鐘，去除上清液，留下細胞核沉澱物。加入 2 ml Solution II，震盪使核沉澱物懸浮，再加入 10 μ l proteinase K，於 37°C 作用隔夜或數天。之後，冰上作用 10 分鐘，加入 0.8 ml Solution III 翻轉混合均勻，靜置於冰上反應 5 分鐘。接著離心 3,400 rpm、4°C 15 分鐘，沉澱細胞蛋白質，收集含有基因組 DNA 的上清液，加入 6 μ l RNase，於 37°C 作用 15 分鐘。再加入 2.5 ml isopropanol，緩慢搖

晃使 DNA 析出。將析出的 DNA 轉移到微量離心管中，離心 14,000 rpm、1 分鐘，以沉澱 DNA。去除上清液後，加入 0.5 ml 75% 酒精清洗 DNA。再次離心 14,000 rpm、1 分鐘，去除上清液，風乾。加入適量 ddH₂O 使 DNA 回溶並測定 DNA 濃度，保存於 4°C 冰箱備用。

(三) 聚合酶連鎖反應 (PCR) 及 *TBP* 基因型分析 (Genotyping)

取 100 ng 的基因組 DNA，進行總體積 25 μ l 的 PCR 反應。反應溶液中包含 50 ng 的 primer (Forward : 5'-hex-ATGCCTTATGGCACTGGACTG ; Reverse : 5'-CTGCTGGGACGTTGACTGCTG)、1 mM MgCl₂、10% DMSO、200 μ M dNTP、0.5 U *Tag* DNA polymerase (Promega)。反應條件為 94°C 6 分鐘，使 DNA 雙股裂解，再以循環式裂解溫度 94°C 30 秒、54°C 30 秒，及 72°C 30 秒，進行 45 個循環作用，最後 72°C 作用 10 分鐘。待 PCR 反應完成後，以 1.6% 洋菜膠電泳檢查 PCR 放大產物 (201-255 bp for 27-45 repeats)。確認完成之 PCR 產物，取 1 μ l，加入 16 μ l ddH₂O 稀釋，進行基因型分析 (MegaBACE500, Amersham Bioscience Ltd.，國立臺灣師範大學遺傳多樣性實驗室)。原始數據利用軟體 (MegaBACE Analyzer) 分析判讀其基因型，推算三核苷酸 CAG/CAA 重複次數。若有大於 44 個重複次數的樣本，則進一步以

1.8% 洋菜膠電泳純化 PCR 產物，進行 DNA 定序確認。

二、SCA17 病患淋巴細胞株模式

(一) 細胞來源

SCA17 病患淋巴細胞株為 CC3313、CC4179、CC4524，其 *TBP* 等位基因 (allele) 之 CAG/CAA 重複次數分別為 36/55、33/46、37/44，由台北榮民總醫院周邊神經科宋秉文醫師所提供。正常人淋巴細胞株 95CT167、95CT277、95CT209，由林口長庚紀念醫院神經肌肉疾病科吳逸如醫師、陳瓊美醫師所提供。其性別與年齡配對詳細情形與 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 重複次數資料列於表一。

(二) 細胞培養

正常人與 SCA17 病患之淋巴細胞株培養於 37°C、5% CO₂ 且溼度穩定之細胞培養箱中。細胞培養液為含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1.0 mM sodium pyruvate、1.5 g/L sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin 及 100 U/ml streptomycin 之 RPMI 1640 培養液 (Gibco)。每隔一至兩天添加 5 或 10 ml 新鮮培養液，每兩週進行 1:3-1:4 繼代培養，以 1,200 rpm，離心 5 分鐘，去除上清液，收集細胞換至新 T75 細胞培養瓶。細胞冰凍保存，使用含有 12.5%

DMSO 與 20% FBS 之冷凍培養液，保存於液態氮桶中。

(三)細胞死亡率- Trypan blue 排除檢測(Trypan blue exclusion assay)

三位正常人(95CT277、95CT209、95CT167)與三位 SCA17 病患(CC3313、CC4179、CC4524)的淋巴細胞株，各培養 1×10^5 細胞於 96 孔盤中，每孔中含有 100 μ l RPMI 1640 培養液(含 10% FBS 或無 10% FBS)，於 37°C，5% CO₂ 環境下培養 34 小時，進行血清有無去除處理。氧化壓力處理則培養相同細胞數，於含 10% FBS 或無 10% FBS 之 100 μ l RPMI 1640 培養液條件下，培養 10 小時後，分別進行 0 μ M 及 10 μ M 濃度之氧化劑 *tert-butyl hydroperoxide solution* (簡稱 TBH) 處理 24 或 48 小時。取 20 μ l 細胞液，和 20 μ l 0.4% Trypan blue (Gibco) 混合均勻，於光學顯微鏡下分別計算活細胞(亮)及死細胞(藍色)數量，求得細胞死亡率。實驗進行三重複，且每次實驗進行二重複，並重複取兩次細胞液進行計數。

(四)淋巴細胞株的蛋白質分析

1. 蛋白質萃取

培養 5×10^6 的正常人與 SCA17 病患淋巴細胞株於 T25 培養瓶，每瓶含有 5 ml RPMI 1640 培養液(含 10% FBS 或無 10%

FBS)，進行上述相同血清去除與氧化壓力條件處理。之後收集細胞以 PBS 清洗兩次後，萃取蛋白質，其方法如下：細胞加入適量 Triton-100 buffer (0.5% Triton-100 - 5% Glycerol - 1 mM DTT - 1 × protease inhibitor mixture - PBS)，靜置於冰上作用 15 分鐘後，離心 14,000 rpm、4°C 30 分鐘，取出上清液即完成，保存於 -80°C。

2. 西方轉漬法 (Western blotting)

蛋白質先經 Bio-Rad Protein Assay 定量後，取等量蛋白質加入適量 sample buffer (50 mM Tris, pH6.8 - 2% SDS - 10% Glycerol - 2.5% β -mercaptoethanol - 0.005% bromophenolblue)，沸水浴 5 分鐘後，進行 10% SDS-聚丙烯醯胺電泳 (簡稱 SDS-PAGE) 以分離蛋白質。待電泳完，利用 XCell II TM Blot Module (Invitrogen) 及 transfer buffer (25mM Tris - 0.2M Glycine - 20% methanol) 將蛋白轉漬至硝化纖維膜 (nitrocellulose transfer membrane, Whatman) 上。之後浸泡於 blocking buffer (3% non-fat milk - PBS) 隔夜。Blocking 完後以清洗液 (10 mM Tris-HCl pH8.0 - 0.05% Tween 20) 清洗膜三次，每次 15 分鐘。加入一級抗體 Goat anti-GRP78 (C-20; sc-1051, Santa Cruz) 稀釋 200 倍、Goat anti-HSC70 (K-19; sc-1059, Santa Cruz) 稀釋 200 倍、Goat anti-HSPB1 (C-20; sc-1048, Santa Cruz) 稀釋 1000 倍、或控制組 Mouse anti- β -actin (C4, Chemicon) 稀釋 5000 倍。於室

溫下作用 2 小時後，清洗膜三次，每次 15 分鐘。接著加入 horseradish peroxidase (HRP) conjugated donkey anti-goat IgG (H&L)(sc-2020, Santa Cruz, 稀釋 5000 倍)或 goat anti-mouse IgG (H&L)(Jackson, 稀釋 10000 倍)二級抗體，於室溫作用 1.5 小時。之後清洗膜三次，每次 15 分鐘。最後加入冷光呈色試劑 (Millipore)於膜上，以 ImagerReader LAS-3000 軟體偵測蛋白表現。上述蛋白質萃取實驗重複進行兩次，每次萃取的蛋白液重複兩次西方轉漬分析。最後將四次呈色結果利用 AlphaImager 軟體進行定量分析。

三、誘導式 SCA17 細胞模式

(一) 細胞來源

誘導式細胞株由 Invitrogene 公司購得 Flp-InTM T-REXTM 293 細胞株，以及 Flp-In T-Rex 的誘導系統，進一步建立 SCA17 細胞模式。

(二) 細胞培養

Flp-InTM T-REXTM 293 細胞，其完全培養液為 DMEM 培養液 (Gibco)，包含 10% FBS、1.0 mM sodium pyruvate、1.5 g/L sodium

bicarbonate、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin，另加入 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin 及 15 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin S 兩種篩選細胞之抗生素。培養於 37°C，5% CO₂ 且溼度穩定之細胞培養箱中，並以 1:5 - 1:10 進行繼代培養。

(三) 不完整 N 端 TBP (tNTBP) 重組質體構築

將 pYES2-tNTBP-Q₃-EGFP、pYES2-tNTBP-Q₅₄-EGFP 載體 (黃慧茹, 2007) 以限制酵素 *Bam*HI、*Pst*I 作用並純化 tNTBP-Q₃、tNTBP-Q₅₄ 片段，並利用限制酵素 *Pst*I、*Not*I 切出並純化 EGFP 片段，進而與 *Bam*HI、*Not*I 切割的 pcDNA5/FRT/TO 載體純化片段，進行接合反應 (ligation)。然後將重組載體利用細菌轉形作用 (transformation) 轉入勝任細胞內，挑選單一菌落進行質體 DNA 小量製備。經限制酵素切割圖譜分析與 DNA 定序確認後，選殖成功重組質體 pcDNA5/FRT/TO-tNTBP-Q₃-EGFP 與 pcDNA5/FRT/TO-tNTBP-Q₅₄-EGFP 之菌落進行質體大量製備與保存。此段 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 序列可表現不完整 N 端的 TBP，包含第 1-57 個胺基酸、Q₃ 或 Q₅₄ 多麩醯胺鏈及之後的 3 個胺基酸，並與 EGFP 相連形成融合蛋白。

1. DNA 片段純化

將限制酵素作用過之載體 DNA，進行洋菜膠電泳分離，切下所需的 DNA 片段，利用 Gel extraction kit (Viogene) 進行膠體純化，其方法如下：先加入 700 μ l GEX buffer，置於 60°C 乾浴器中 10 分鐘，使膠體溶解後，移至純化管柱中，離心 13,000 rpm、1 分鐘，去除廢液。加入 500 μ l wash I buffer，離心 13,000 rpm、1 分鐘，去除廢液。接著加入 700 μ l wash II buffer，離心 13,000 rpm、1 分鐘，去除廢液。再次離心 13,000 rpm、1 分鐘後，將管柱移至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 20 μ l ddH₂O，靜置於室溫 5-10 分鐘，離心 13,000 rpm、1 分鐘，收集溶液，即完成 DNA 片段純化。最後取 2 μ l 純化後的 DNA 進行洋菜膠電泳檢查。

2. 轉形勝任細胞 (Competent cells) 製備

接種大腸桿菌 TOP-10 F' (Invitrogen) 單一菌落至 1 ml 含 tetracycline 的 LB 培養基中 (10 g/l trypton - 5 g/l yeast extract - 10 g/l NaCl)，於 37°C、200 rpm 震盪培養。4-6 小時後倒入 100 ml LB 中，以 37°C、200 rpm 繼續震盪培養隔夜。然後平均倒入四個 500 ml 錐形瓶中，每瓶各含 250 ml LB，繼續培養約 4-6 小時，使 OD₆₀₀ 達到 0.6-0.7。接著將菌液置於冰上 10 分鐘，離心 4,000 rpm、4°C 5 分鐘沉澱細菌細胞，並去除上清液。加入 250 ml 預冷之 ddH₂O 懸浮細胞，再次離心 4,500 rpm、4°C 5 分鐘，去除上清液，共重複四次

清洗細胞。最後加入 1 ml 20% glycerol 懸浮細胞，分裝成每管 40 μl ，保存於 -80°C 備用。

3. 接合反應

在總反應體積為 5 μl 的接合反應中，取適量純化的 DNA 片段、0.5 μl 的 $10\times$ buffer (300 mM Tris - HCl pH7.8 - 100 mM MgCl_2 - 100 mM DTT - 10 mM ATP) 與 0.25 μl T4 DNA ligase (3U)，混合均勻後，於 16°C 作用隔夜。

4. 細菌轉形作用 (Transformation)

將接合反應完成之溶液置於 70°C 乾浴器中作用 10 分鐘，終止 T4 DNA ligase 的酵素反應，並迅速置於冰上。於冰上解凍轉形勝任細胞，取 20 μl 的勝任細胞加入 2 μl 完成接合反應的重組載體 DNA，混合均勻後，以 1.25 kV、25 μF 、200 Ω 進行電穿孔 (electroporation) (BIO-RAD, GENE PULSERII)，完成轉形作用。然後加入預冷的 500 μl LB，於 37°C 培養 30 分鐘，各取 150-200 μl 至每盤含 50 $\mu\text{g/ml}$ 青黴素 (ampicillin) 的 LB 培養基中，最後以滅菌過玻棒將菌液均勻塗抹，將培養皿置於 37°C 培養箱中繼續培養 16-18 小時。

5. 質體 DNA 小量製備

利用滅菌牙籤挑選轉形作用後生長出的單一菌落，劃在含篩選抗生素的培養基上保留菌種，同時置於含篩選抗生素的 1 ml 培養液中，於 37°C、200 rpm 培養隔夜。之後將菌液離心 13,000 rpm、1 分鐘，去除上清液。接著以鹼性溶菌法抽取質體 DNA，其方法如下：加入 70 μ l solution I (50 mM glucose - 25 mM Tris-HCl pH8.0 - 10 mM EDTA pH8.0) 劇烈震盪使菌液懸浮。再加入 140 μ l solution II (0.2 N NaOH - 1% SDS)，溫和反轉數次後，加入 105 μ l solution III (3M potassium acetate)，溫和反轉數次。離心 14,000 rpm、10 分鐘以沉澱細胞碎片，取出含有核酸之上清液，加入 0.8 倍體積異丙醇，溫和混合均勻後，再次離心 14,000 rpm、1 分鐘，去除上清液，可見白色核酸沉澱物。以 70% 酒精清洗多餘鹽類後，倒扣風乾，再將沉澱物溶於 40 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 ddH₂O 中，置於 37°C 水浴槽 10 分鐘，幫助 DNA 溶解。最後取 2 μ l 以 0.8% 洋菜膠電泳檢查重組載體 DNA 大小的正確性，並以限制酵素切割確認插入片段的正確性。

6. 質體 DNA 大量製備

挑選經限制酵素圖譜分析與定序確認之重組載體菌落培養於含篩選抗生素 1 ml 培養液中，於 37°C、200 rpm 培養 2-3 小時後倒入 65 ml 含篩選抗生素培養液中，繼續培養隔夜。之後利用 Viogene

Ultrapure Plasmid Midiprep System (Midi-prep-V100) 抽取質體 DNA 與純化。方法如下：先將菌液離心 8,000 rpm、5 分鐘，去除上清液，加入 4 ml VP1 buffer，劇烈震盪使細菌懸浮，再加入 4 ml VP2 buffer，靜置 5 分鐘後，溫和反轉數次。然後加入 4 ml VP3 buffer，反轉數次後，離心 12,000 rpm、4°C 15 分鐘。此時準備 Midiprep - V100 管柱，加入 10 ml VP4 buffer，潤洗管柱內膜。接著將離心後的上清液倒入管柱內，利用重力作用讓菌液通過管柱，並加入 15 ml VP5 buffer 清洗雜質。之後加入 5 ml VP6 buffer 沖洗出含有重組載體 DNA 的溶液。接著加入 3.75 ml 異丙醇溫和反轉數次後，離心 14,000 rpm、10 分鐘，即可看到白色 DNA 沉澱物，再經溶解、二次沉澱、70% 酒精清洗與風乾後，將 DNA 溶於 200 μ l ddH₂O，置於 37°C 水浴槽 10 分鐘，幫助 DNA 溶解。最後經限制酵素切割圖譜分析確認與 OD₂₆₀ 測定 DNA 濃度，保存於 -20°C。

(四) 誘導式 SCA17 細胞株建立

建立誘導式 SCA17 細胞模式的流程如圖一所示。Flp-In™ T-REX™ 293 細胞株基因上含有 FRT (Flp Recombinase Target) 序列與 TetR (Tet repressor) 基因可調控下游基因表現，另有細胞抗生素篩選基因 (圖一 A)，藉由構築不完整 N 端 TBP 相連綠螢光蛋白 (tNTBP-Q_{3/54}-EGFP) 的基因片段在具有相同 FRT 序列與

Hygromycin 篩選基因的 pcDNA5/FRT/TO 表現載體上，與表現重組酵素 (Flp Recombinase) 的 pOG44 載體共轉移至 Flp-In™ T-REX™ 293 細胞株中 (圖一 B)，可將不完整 N 端 TBP 相連綠螢光蛋白的 (tNTBP-Q_{3/54}-EGFP) 基因片段單一重組嵌入細胞基因中。而 pcDNA5/FRT/TO 載體上能驅動 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 表現的 CMV/TetO₂ 啟動子，被 TetR 蛋白結合時，會抑制基因的表現，因此利用加入 tetracycline 或結構類似物 doxycycline 與 TetR 蛋白結合，進而抑制 TetR 蛋白與啟動子結合，使 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 表現 (圖一 C)。本實驗中即利用 1 µg/ml doxycycline 誘導 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 表現，並觀察誘導 2 天及 4 天細胞表現情形。

先取 DNA 量為 1 比 9 的 pcDNA5-tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 重組質載體與 pOG44 載體，總 DNA 量為 2.5 µg，以等體積混勻，加入不含血清與抗生素之 OptiMEM 培養液 (Gibco) 至 100 µl 混勻作用 5 分鐘。再配製 4 µl 脂質試劑 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 混以 OptiMEM 培養液至 100 µl，作用 5 分鐘。接著於 12 孔細胞培養盤中，每孔各加入 100 µl 的 DNA 混合液與 Lipofectamine 2000 混合液，充分混勻作用 20 分鐘後，加入 1 ml 含有 1 × 10⁶ 的 Flp-In™ T-REX™ 293 細胞液混合均勻。此時使用 DMEM 含 10% FBS 但不加入篩選抗生素之培養液進行培養。待細胞貼附後，改以

DMEM 含 10% FBS 並加入 200 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B 及 15 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin S 進行篩選基因轉移成功的細胞株。另外，共轉移空載體 pcDNA5/FRT/TO(簡稱 Vec)與 pOG44 載體至 Flp-InTM T-REXTM 293 細胞中，當作控制組。

(五) 誘導式 SCA17 細胞株的 RNA 分析

1. RNA 萃取

利用 Trizol reagent (Invitrogen) 進行 RNA 萃取，細胞以 PBS 清洗過後，加入 500 μl Trizol reagent 沖散在培養盤上的細胞並收集至微量離心管。冰上作用 5 分鐘後，加入 1/5 倍體積的 chloroform 並上下反轉，使之混合均勻，置於冰上作用 5 分鐘。離心 13,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 15 分鐘，以分離 RNA、DNA 和蛋白質。小心吸取含有 RNA 的上清液至乾淨微量離心管中，並加入 0.8 倍體積的 isopropanol 混合均勻，-20 $^{\circ}\text{C}$ 作用至少 1 小時。再次離心 13,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 15 分鐘，以沉澱 RNA。去除上清液後，加入 1 ml 70% EtOH (in DEPC- ddH₂O) 潤洗。離心 13,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘後，去除上清液，留下 RNA pellet 風乾。最後加入適量 DEPC-ddH₂O 使 RNA 回溶。進一步，利用 0.8% 洋菜膠電泳確認 RNA 品質。並測定 OD₂₆₀ 得知 RNA 濃度，保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 反轉錄作用 (Reverse transcription)

先取 6.25 μg RNA 加入 0.5 μl Rnase-free Dnase 進行總體積 25 μl 的酵素作用，接著利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. No.4368814, Applied Biosystems) 進行反轉錄作用，其方法如下：取 2 μg 的 RNA，反應總體積為 20 μl ，溶液中包含 2 μl 10 \times RT buffer、0.8 μl 25 \times dNTP Mix (100 mM)、2 μl 10 \times RT Random primer、1 μl MultiScribeTM reverse transcriptase，反應條件為 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘，再以溫度 37 $^{\circ}\text{C}$ ，作用 120 分鐘，最後 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 秒終止反應。完成反轉錄作用之 cDNA 產物保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 同步定量 PCR (Real-time PCR)

同步定量 PCR 使用的 TBP 螢光探針為 Hs 00920494_m1 (TaqMan, Applied Biosystems)，HSPB1 螢光探針為 Hs 00356629_g1 (TaqMan, Applied Biosystems)，且皆使用 HuHPRT 螢光探針 (4326321E, Applied Biosystems) 當內生性對照組。反應溶液總體積為 25 μl ，包含 25 或 50 ng cDNA、1 \times mix solution (2 \times TaqMan Universal PCR Master mix - 20 \times Primer/Probe mixture)。反應以 ABI PRISM 7000 Sequence Detectin System 儀器進行，條件設定為 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘，再 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘裂解雙股 cDNA，接著以循環式的裂

解溫度 95°C 15 秒，60°C 60 秒，進行 40 個循環作用後，以 ABI Prism 7000 SDS 軟體紀錄 C_T 值變化，並利用 $2^{-\Delta C_T}$ ， $\Delta C_T = C_T$ （對照組） $- C_T$ （實驗組）進行 RNA 表現量的計算。上述 RNA 萃取、反轉錄作用實驗重複進行兩次，所合成的 cDNA 重複兩次同步定量 PCR，最後將四次結果進行統計分析。

（六）誘導式 SCA17 細胞株的蛋白質分析

蛋白質萃取與西方轉漬法同淋巴細胞株實驗。使用之一級抗體除前述 Goat anti-GRP-78、Goat anti-HSC70、Goat anti-HSPB1、Mouse anti- β actin 外，另使用 Rabbit anti-GFP（BD）稀釋 400 倍與 Mouse anti-1C2（Chemicon）稀釋 10000 倍進行檢測 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 的融合蛋白分子量的正確性與表現情形（1C2 為辨識擴增聚麩醯胺鏈的專一性抗體）。使用之二級抗體除上述之 HRP conjugated donkey anti-goat IgG（H&L）與 goat anti-mouse IgG（H&L）外，尚包含稀釋 2000 倍之 alkaline phosphatase（AP）conjugated goat anti-rabbit IgG（H&L）（Zymed）與 goat anti-mouse IgG（H&L）（Zymed）。上述蛋白質萃取實驗重複進行兩次，每次萃取的蛋白液重複兩次西方轉漬分析。最後將四次呈色結果利用 AlphaImager 軟體進行定量分析。

(七) 次細胞蛋白質分群 (Subcellular protein fractionation) 分析

利用 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Cat. No. 78833, Pierce) 進行次細胞蛋白質分離及製備，其方法如下：離心 500 g、4°C 3 分鐘，收集誘導 2 天的誘導式 SCA17 細胞 (20 μ l 體積)，加入 200 μ l 含有蛋白酶抑制劑 (protease inhibitors) 之 CER I，震盪 15 秒，使細胞完全懸浮，置於冰上作用 10 分鐘。再加入 11 μ l CER II，震盪 5 秒，冰上作用 1 分鐘後，再次震盪 5 秒，取 30 μ l 溶液當總蛋白質萃取液 (total protein extract)。離心 16,000 g、4°C 5 分鐘，取出上清液即細胞質蛋白萃取液 (cytoplasmic extract)。底層不溶解物質，加入 100 μ l NER，進行震盪 15 秒，冰上作用 10 分鐘，重複四次共 40 分鐘，使其完全溶解。離心 16,000 g、4°C 10 分鐘，取出上清液即核蛋白萃取液 (nuclear extract)。總蛋白質經定量後，取相同體積之總蛋白質、細胞質蛋白與核蛋白萃取液，進行西方轉漬蛋白質分析。使用一級抗體包含：稀釋 2000 倍之 Mouse anti- β tubulin (T4026, Sigma)，作為細胞質蛋白標記；稀釋 1000 倍之 Rabbit anti-PARP (H-250) (sc-7150, Santa Cruz)，作為核蛋白標記；稀釋 500 倍之 Rabbit anti-GFP (FL) (sc-8334, Santa Cruz) 與稀釋 3000 倍之 Mouse anti-1TBP18 (Abcam) 偵測 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白表現。使用的二級抗體為稀釋 10000 倍之 HRP conjugated

goat anti-mouse IgG (H&L)(Jackson)與 goat anti-rabbit IgG (H&L) (Rockland)。

(八) 細胞螢光觀察

培養 1.5×10^4 之 tNTBP-Q₃-EGFP、tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞於已經過 poly-L-lysine (100 µg/ml, Sigma) 處理 coverslips 的 12 孔盤中，以 1 µg/ml doxycycline 誘導 2 天及 4 天後，進行固定染核，其方法如下：細胞以 PBS 潤洗三次後，加入以 PBS 配製的 4% paraformaldehyde 進行固定作用 10 分鐘，更換溶液為 PBS 配製的 0.1% Triton X-100 作用 10 分鐘。重複兩次後，以 PBS 潤洗兩次，加入 0.05% DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, 細胞核染劑)，避光作用 20-30 分鐘。之後以 PBS 清洗三次，進行封片。使用 Leica TCS SP2 螢光顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白的表現、聚集情形與表現位置等。

(九) 細胞存活率檢測

1. WST-1 細胞增生檢測 (WST-1 cell proliferation assay)

培養 1.5×10^4 Vec、tNTBP-Q₃-EGFP、tNTBP-Q₅₄-EGFP 之誘導式細胞株於 96 孔盤中，每孔中含有 100 µl 之 DMEM 完全培養液 (含 200 µg/ml Hygromycin B 及 15 µg/ml Blasticidin S)，培養

24 小時後，實驗組加入 1 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 進行誘導表現，控制組加入 ddH₂O，經 24 小時後，進行 0 nM、20 nM、50 nM、100 nM Staurosporine(簡稱 STS)細胞凋亡誘導劑與 0 nM、20 nM、50 nM、100 nM MG132 蛋白酶體抑制劑的處理 24 小時後，再加入 PreMix WST-1 細胞增生檢測試劑 (Takara)，作用 3 小時，測其 OD₄₅₀，檢測細胞存活率 (cell viability)，每種藥物處理實驗進行三重複，每次實驗亦進行三重複。

2. MTT 細胞增生檢測 (MTT cell proliferation assay)

如上述，培養細胞於 96 孔盤中，24 小時後，進行 0 μM 、20 μM 、50 μM TBH 處理 24 小時後，加入 MTT 試劑 (5 mg/ml, Sigma)，作用 3 小時，測其 OD₅₇₀，檢測細胞存活率 (cell viability)，實驗進行三重複，每次實驗亦進行三重複。

候選藥物 valproate (簡稱 VPA) 為組蛋白去乙酰酶抑制劑 (histone deacetylases inhibitor)，其檢測方法如下：先培養 0.5×10^4 誘導式細胞於 96 孔盤中，24 小時後，進行 0 μM 、100 μM 、200 μM 、500 μM VPA 處理 48 小時，控制組加入 ddH₂O 不進行誘導，實驗組加入 1 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline 進行誘導表現，經 48 小時，再加入 MTT 試劑 (5 mg/ml, Sigma)，作用 3 小時，測其 OD₅₇₀，檢

測細胞存活率 (cell viability)，實驗進行三重複，每次實驗亦進行三重複。

肆、結果

一、*TBP* 等位基因之族群遺傳分析

為瞭解臺灣人族群中 *TBP* 等位基因的 CAG/CAA 三核苷酸重複次數的情形與分布，以及與神經退化性疾病之間的相關性，我們藉由基因型分析技術，完成 69 位正常人的 138 條染色體，74 位帕金森氏症患者的 148 條染色體，55 位原發性顫抖患者的 110 條染色體與 86 位其它神經退化性疾病患者或家屬 172 條染色體的遺傳分析。由圖二分析結果，在正常人族群中 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數的頻率分布在 32 到 43 個之間，以 36 個重複序列的等位基因最常見，佔 67.2%；帕金森氏症患者族群之頻率分布在 33 到 43 個之間，36 個重複序列的頻率最高，佔 60.8%；原發性顫抖患者族群其頻率分布在 29 到 40 個之間，以 36 個重複序列佔 55.7% 居多；其它神經退化性疾病患者或家屬的族群則分布在 27 到 45 個之間，也以 36 個重複序列佔 68.8% 最多。各族群間 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 重複次數的詳細情形與頻率列於表二。

圖三為各族群中每一樣本 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 重複次數分布情形。在所分析的族群樣本中，發現在其它神經退化性疾病患者

或家屬的族群中有兩個具有不正常擴增的 CAG/CAA 重複序列：包括一位眼咽肌肉失調症（oculopharyngeal muscular dystrophy，簡稱 OPMD）病人含有 45 個重複序列，與一位妥瑞氏症、抽動症（tic syndrome，簡稱 TICS）病人具有 44 個重複序列，其 CAG/CAA 重複序列變異的情形均經定序分析後如表三所示。

二、淋巴細胞株對氧化壓力之耐受性

由於氧化壓力可能參與 polyQ 疾病的致病機轉，因此我們想測試帶有擴增 polyQ 蛋白的 SCA17 細胞株是否對氧化壓力耐受性較差，進而促使細胞死亡。所以，我們利用正常人與 SCA17 病患的淋巴細胞株經血清去除與氧化劑 TBH 處理後，以 Trypan blue 排除檢測法計算細胞死亡率，並將結果以各株 10% 血清與 0 μ M TBH 處理為 100% 後，進行標準化，計算相對細胞死亡率。結果如圖四所示，淋巴細胞株於正常 10% 血清培養下，處理 10 μ M TBH 24 小時後，三位正常人的相對細胞死亡率在 100.3% 到 110.4% 之間，SCA17 病患則在 103.4% 至 124.7% 之間，其中 CC3313 (P1) 與 CC4179 (P2) 兩位病患的細胞死亡率顯著上升 (P 值分別為 0.003 ; 0.033)。進一步，在同樣正常血清培養下，10 μ M TBH 處理 48 小時後，三位正常人的相對細胞死亡率在 109.3% 到 115.6% 之間，SCA17 病患則在

117.6% 至 131.6% 之間，其各株淋巴細胞株相對細胞死亡率大多隨 TBH 處理時間增長而有所上升，並且與前述處理 24 小時 10 μ M TBH 的兩株病患淋巴細胞株 CC3313 (P1) 與 CC4179 (P2) 在 10 μ M TBH 處理 48 小時後，細胞死亡率也達顯著水準 (P 值分別為 0.019 ; 0.011)，有明顯增加的情形。

此外，在血清去除處理下，各株淋巴細胞株其相對細胞死亡率在 111.1% 到 163.5% 之間，其中三位正常人與兩位 SCA17 病患的細胞死亡率都有顯著上升。接著，於無血清培養狀況，進行 10 μ M TBH 處理 24 小時後，三位正常人的相對細胞死亡率在 123.3% 到 158.3% 之間，SCA17 病患則在 155.0% 到 207.5 % 之間，細胞死亡率均有顯著增加，顯示在血清去除與 TBH 雙重處理下，無論 SCA17 病患或正常人的淋巴細胞株其細胞均有嚴重死亡情形。另一方面，當以各株淋巴細胞株於相同血清去除條件下，統計分析 0 μ M TBH 與 10 μ M TBH 處理的細胞死亡率，則可發現三位 SCA17 病患 CC3313 (P1)、CC4179 (P2) 與 CC4179 (P3) 在處理 10 μ M TBH 後，細胞死亡率有明顯增加，均達顯著水準 (P 值分別為 0.003 ; 0.002 ; 0.008)，而三位正常人淋巴細胞株無顯著差異，代表 SCA17 病患的淋巴細胞株在無血清狀況下面臨氧化壓力時，比起正常人更容易導致細胞死亡。

三、淋巴細胞株之熱休克蛋白表現

進一步我們想瞭解在處理血清去除、氧化劑 TBH 或兩種處理共同作用下，正常人與 SCA17 病患淋巴細胞株的熱休克蛋白表現情形是否有差異。由圖五利用西方轉漬法，以抗體 GRP78 偵測 HSPA5 的結果可看到不同處理情形下，三位 SCA17 病患與三位正常人的 HSPA5 蛋白表現並無明顯差別。接著將結果經 AlphaImager 軟體分析後，以正常人淋巴細胞株 95CT277 (C1) 之 HSPA5 對 β -actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量，如圖六所示，於不同處理情形下，各株淋巴細胞株相對蛋白表現量在 0.89 至 1.21 之間。而經 ANOVA 單因子變異數分析後，SCA17 病患與正常人兩群淋巴細胞株的 HSPA5 相對蛋白表現量並無顯著差異。

同時也利用抗體 HSC70 與 HSPB1 偵測淋巴細胞株 HSPA8 及 HSPB1 的表現。其結果在圖七可發現於正常血清培養及 TBH 處理兩種狀況下，HSPA8 蛋白表現情形在各淋巴細胞株間並未有明顯不同。但在血清去除處理以及給予血清去除與 TBH 共同處理的兩種情形下，則三位 SCA17 病患的 HSPA8 蛋白表現都比三位正常人較多。進而計算相對蛋白表現量與 ANOVA 單因子變異數分析後，在

正常血清培養及 TBH 處理兩種狀況下，各株淋巴細胞株 HSPA8 的相對蛋白表現量在 0.98 與 1.18 之間，兩群淋巴細胞株間無明顯差異。然而在血清去除處理以及給予血清去除與 TBH 共同處理情形下，SCA17 病患的 HSPA8 相對蛋白表現量在 1.15 到 1.29 間，正常人則在 0.90 與 1.14 之間，分析兩群淋巴細胞株間的 HSPA8 相對蛋白表現量確實達顯著差異，表示 SCA17 病患的 HSPA8 相對蛋白表現量比正常人高，如圖八所示。

由圖七結果亦可發現在不同處理狀況下，HSPB1 的蛋白表現在各淋巴細胞株間有不同的差異變化。其中 SCA17 病患淋巴細胞株 CC4524 (P3) 與正常人淋巴細胞株 95CT167 (C3) 的 HSPB1 的蛋白表現有較多的情形。另外兩位 SCA17 病患淋巴細胞株 CC3313 (P1) 與 CC4179 (P2)，其 HSPB1 的蛋白表現似乎較少。正常人淋巴細胞株 95CT209 (C2) 的 HSPB1 的蛋白表現最低。圖八則由蛋白表現結果計算相對蛋白表現量，並進行 ANOVA 單因子變異數分析，顯示 SCA17 病患與正常人的 HSPB1 相對蛋白表現量在 0.71 到 1.22 間，兩群淋巴細胞株間並無明顯差異。

四、誘導式 SCA17 細胞模式之建立

為建立誘導式 SCA17 細胞模式，首先將不完整 N 端 TBP 相連綠螢光蛋白的 (tNTBP-Q_{3/54}-EGFP) 基因片段構築於 pcDNA5/FRT/TO 表現載體上，再與 pOG44 載體共轉移至 Flp-In™ T-REX™ 293 細胞株，使 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 基因片段單一重組嵌入細胞基因中。之後進行抗生素篩選二週，開始確認誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 基因表現情形。除 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 細胞外，亦建立僅含 pcDNA5/FRT/TO 表現載體的細胞株 (vector)，作為比較的控制組。

接著利用同步定量 PCR，偵測內生性 *TBP* 及外源性 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 的 mRNA 表現，並將結果相對於 *HuHPRT* mRNA 表現量作圖。如圖九 (A) 所示，誘導表現 0、2、4 天後，vector 細胞的 *TBP* / *HuHPRT* 的相對表現量為 0.24、0.27、0.25，tNTBP-Q₃-EGFP 細胞的 *TBP* / *HuHPRT* 的相對表現量為 0.81、19.69、16.90，tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞的 *TBP* / *HuHPRT* 的相對表現量為 0.84、17.29、18.84。扣除 Vec 所代表的內生性表現量後，以無誘導當作 1.0 倍，計算 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 基因的 mRNA 誘導表現倍數，從圖九 (B) 可知 tNTBP-Q₃-EGFP 基因在誘導表現 2 天後，mRNA 增加約 34 倍；在誘導表現 4 天後，mRNA 增加約 29 倍；tNTBP-Q₅₄-EGFP 基因則在誘導表現 2 天後，mRNA 增加約 28

倍，4 天後增加約 31 倍。由此可知，利用 Flp-In T-Rex 的誘導系統所建立的 SCA17 細胞模式，在誘導表現 2–4 天後，可誘導表現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 的 mRNA，且倍數約達 30 倍。

進一步利用西方轉漬法，以抗體 GFP 辨識 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 的綠螢光融合蛋白，並使用 1C2 抗體辨識 polyQ 蛋白，其結果如圖十所示。首先 GFP 抗體辨識到蛋白分子量約在 35 kDa 的蛋白，符合預期的 tNTBP-Q₃-EGFP 蛋白分子量大小，且可發現經誘導表現 2 天與 4 天的 tNTBP-Q₃-EGFP 蛋白，明顯比無誘導時增加許多。同時，GFP 抗體也可辨識到蛋白分子量約在 45 kDa 的蛋白，接近預期 tNTBP-Q₅₄-EGFP 表現蛋白的分子量大小，進而比較無誘導與誘導 2 天、4 天後蛋白表現情形，可發現 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白表現均有明顯增加。並且值得注意的是，在無誘導狀況下，細胞即有低表現量的 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白產生。此外，Vec 為轉移入空載體的對照組，因此有無誘導表現，均未被 GFP 抗體所辨識。再者，1C2 抗體也約在 45 kDa 處辨識到帶有 polyQ 的 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白。因此，綜合以上結果，顯示所建立的誘導式 SCA17 細胞模式可穩定誘導表現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白。

然後，藉由 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合的綠螢光蛋白，將誘導式 SCA17 細胞株進行 DAPI 細胞核染色，以螢光顯微鏡觀察細胞內

tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白表現位置與情形。由圖十一可清楚看到在誘導 2 天或 4 天後，tNTBP-Q₃-EGFP 蛋白於細胞內表現呈均勻分散，無蛋白聚集產生。而由圖十二，則明顯看到 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白在誘導 2 天或 4 天後，於細胞內表現，並有少數細胞出現少量蛋白聚集的情形，且誘導 4 天後，產生蛋白聚集的細胞有增加的趨勢，然而大部分細胞 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白表現仍呈現均勻分散狀況。

再者，藉由次細胞蛋白質分群方法，分為細胞質蛋白與核蛋白萃取液，偵測 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白於不同次細胞蛋白質分群中的表現，以瞭解 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白於細胞內表現之區域。分析結果如圖十三所示，首先可發現細胞質蛋白標記 β -tubulin (55 kDa) 於細胞質蛋白萃取液中表現量明顯較多；而核蛋白標記 poly (ADP-ribose) polymerase (簡稱 PARP，不活化態為 116 kDa；活化態為 85 kDa) 於核蛋白萃取液中表現量較多，顯示次細胞蛋白質分群方法確實可初步分離細胞質蛋白與核蛋白。接著以 TBP 與 GFP 抗體皆可偵測到 tNTBP-Q₃-EGFP 與 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白於細胞質中表現量居多，而在核內也有低表現量。

五、誘導式 SCA17 細胞模式對藥物之敏感性

在確認建立的誘導式 SCA17 細胞模式可穩定誘導表現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白後，我們進一步測試帶有擴增 polyQ 的細胞株是否對於藥物的敏感性較強。首先誘導式 SCA17 細胞株經細胞凋亡誘導劑 STS、蛋白酶體抑制劑 MG132 處理後，利用 WST-1 細胞增生檢測法計算細胞存活率，並將結果以各株 0 nM STS 與 0 nM MG132 處理為 100% 後，進行標準化，計算其相對細胞存活率，結果顯示於圖十四。圖十四 (A) 表示於無誘導狀況下，處理 20 nM、50 nM 與 100 nM STS，Vec、tNTBP-Q₃-EGFP 及 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株相對細胞存活率在 97.1% 至 76.0% 之間，可看到相對細胞存活率皆隨藥物處理濃度增加而降低，但均未達顯著水準。而細胞於誘導情形下，處理相同濃度 STS，Vec 與 tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株相對細胞存活率在 101.0% 至 86.5% 之間；tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株的相對細胞存活率則在 96.9% 至 75.8% 之間，其相對細胞存活率大多有隨藥物處理濃度增加而下降的趨勢，並可發現 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株於誘導後，處理 100 nM STS 其相對細胞存活率有顯著下降的情形 (*P* 值為 0.026)。

圖十四 (B) 則顯示誘導式 SCA17 細胞模式於無誘導或有誘導狀況下，處理 20 nM、50 nM 與 100 nM MG132，各細胞株在不同濃度下相對細胞存活率在 100.8% 至 96.7% 之間，均無明顯差異。

再者，誘導式 SCA17 細胞株經氧化劑 TBH 處理後，利用 MTT 細胞增生檢測法計算細胞存活率，其結果以各株 0 μM TBH 處理為 100% 後，進行標準化。所計算的相對細胞存活率情形，如圖十五 (A)。Vec 與 tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株在有無誘導狀況下，處理 20 μM 與 50 μM TBH，相對細胞存活率在 99.5% 至 85.5% 之間，其相對細胞存活率隨濃度增加而降低，均未有顯著差異。而 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株在無誘導與有誘導情況下，處理 20 μM TBH，其相對細胞存活率分別為 97.4% 與 95.8%，有下降趨勢，但未達顯著水準。相反的，在處理 50 μM TBH 後，相對細胞存活率則明顯下降至 85.2% 與 73.2% (P 值分別為 0.016；0.031)。

另一方面，針對候選藥物 VPA 所進行的測試結果如圖十五 (B) 所示，誘導式 SCA17 細胞株先處理 0 μM 、100 μM 、200 μM 、500 μM VPA，再進行無誘導與誘導表現，以 MTT 細胞增生檢測細胞存活率。將結果以各株 0 μM VPA 處理為 100% 後，進行標準化，求得相對細胞存活率。在不同濃度 VPA 處理後，進行有無誘導表現，各細胞株相對細胞存活率在 106.1% 與 82.6% 之間，其中可發現先使用 100 μM VPA 處理細胞株，對於無誘導的 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株及有誘導的 tNTBP-Q₃-EGFP 和 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株有明顯提升細胞存活率的作用 (P 值分別為 0.006、0.048、0.042)。

六、誘導式 SCA17 細胞模式之熱休克蛋白表現

進一步，為瞭解誘導式 SCA17 細胞株表現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白，對於熱休克蛋白表現是否有影響，我們將誘導式 SCA17 細胞株培養於正常與血清去除兩種狀況下，再藉由西方轉漬法，觀察熱休克蛋白表現情形，之後將蛋白表現結果量化，以 Vec 細胞株於血清去除狀況下，熱休克蛋白對 β -actin 蛋白表現強度相對比值當作 1.0，求得相對蛋白表現量。從圖十六結果可看出 Vec、tNTBP-Q₃-EGFP 和 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株在兩種狀況下，HSPA5 的表現並未有明顯差異，其相對蛋白表現量在 0.92 至 1.10 間。而圖十七則顯示各細胞株的 HSPA8 表現情形，蛋白相對表現量在 0.92 到 1.06 之間，也無顯著差異。另外，對於 HSPB1 表現的影響如圖十八所示，於正常培養下 Vec 細胞株的 HSPB1 相對蛋白表現量為 1.15，tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株降低至 0.14，tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株則為 0.50；於血清去除處理狀況下，其 tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株 HSPB1 相對蛋白表現量為 0.15，tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株則為 0.49，顯示 SCA17 細胞株表現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白在正常或血清去除狀況下均會明顯使 HSPB1 表現量減少。

另外，也利用同步定量 PCR 偵測誘導式 SCA17 細胞株

HSPB1 mRNA表現，並將結果相對於 *HuHPRT* mRNA 表現量作圖，如圖十九 (A) 所示，於正常血清培養下，vec、tNTBP-Q₃-EGFP、tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞的 *HSPB1* / *HuHPRT* 的相對表現量分別為 0.35、0.04、0.23；而於血清去除處理，vec、tNTBP-Q₃-EGFP、tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞的 *HSPB1* / *HuHPRT* 的相對表現量為 0.34、0.03、0.17。圖十九 (B) 則以 Vec 細胞株於血清去除狀況下之 *HSPB1* / *HuHPRT* 相對表現量當作 1.0 倍，求得 *HSPB1* mRNA 表現倍數。可看到於正常培養下 Vec 細胞株的 *HSPB1* mRNA 表現為 1.04 倍，並無顯著差異；而 tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株顯著降低至 0.13 倍；tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株則雖有降低趨勢，但未達顯著水準，為 0.69 倍。於血清去除處理狀況下，tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株更明顯降低至 0.10 倍；tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株也顯著下降至 0.50 倍，顯示 SCA17 細胞株 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 的表現也會使 *HSPB1* mRNA 表現量減少。

伍、討論

一、*TBP* 等位基因之族群遺傳分析

本篇研究中針對臺灣地區正常人族群、帕金森氏症患者族群、原發性顫抖患者族群，以及其它神經退化性疾病患者或家屬族群，所進行的 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 重複序列基因型的族群遺傳分析，可看出各族群間 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數的頻率分布情形並無明顯差異，且 CAG/CAA 重複次數的頻率主要集中在 36 個重複序列，分布範圍在 27 到 45 之間（圖二與圖三），結果與 Wu 等學者所做的研究相符（Wu et al., 2005）。

此外，在正常人族群、帕金森氏症患者族群及原發性顫抖患者族群中，均未發現有 *TBP* 基因重複序列不正常擴增的例子，但在其它神經退化性疾病患者或家屬族群中，發現到一位 OPMD 病人與一位 TICS 病人具有 CAG/CAA 重複序列不正常擴增的 *TBP* 等位基因，顯示 *TBP* 基因的不正常擴增重複序列，可能與這些神經疾病的發生有關，建議可進一步追蹤這兩位病患是否有病情加重或出現 SCA17 症狀，以瞭解 *TBP* 等位基因的不正常擴增重複序列是否會影響不同的神經退化性疾病的症狀或發展。

二、淋巴細胞株對去血清及氧化壓力之耐受性

培養的淋巴細胞株在正常血清狀況下進行 10 μ M 氧化劑 TBH 處理 24 小時後，含 TBP-Q₅₅ 的 CC3313 與 TBP-Q₄₆ 的 CC4179 的 SCA17 病患淋巴細胞株相對死亡率明顯上升，且隨藥物處理時間增加（48 小時），死亡率也提升（圖四），顯示這兩株帶有較長 CAG/CAA 重複擴增的 SCA17 病患淋巴細胞株對氧化壓力的耐受性較差，推論細胞對於氧化劑所引起的氧化壓力無法誘導產生或產生不足夠的壓力反應，來抵抗氧化傷害，因而使細胞走向死亡路徑。相反的，正常人的淋巴細胞則能誘發壓力反應，來避免或降低各種壓力的傷害。

於去血清處理實驗中，發現五株淋巴細胞株相對細胞死亡率均明顯上升，顯示血清去除處理會嚴重影響到細胞存活，可能因為血清中含有豐富的細胞存活與生長所必須的養分，一旦去除就容易造成細胞死亡。

另外，可能也與個體差異有關，含 TBP-Q₄₄ 的 CC4524 這一 SCA17 病患淋巴細胞株在正常血清狀況下處理氧化劑與血清去除處理，其相對細胞死亡率均未顯著增加，但在給予血清去除與氧化劑處

雙重處理下，則可看到與另外兩位 SCA17 病患淋巴細胞株般，其相對細胞死亡率均明顯提高。故推論帶有 CAG/CAA 重複擴增的 SCA17 淋巴細胞株，對氧化壓力的耐受性顯著低於年齡、性別配對的正常人淋巴細胞株。

綜合以上淋巴細胞株的實驗結果，推論帶有 SCA17 polyQ 擴增的細胞對氧化壓力耐受性較差，故氧化壓力可能也是造成 SCA17 疾病的機轉之一。此現象於 SCA3 的研究中也有發現，當 SK-N-SH 細胞具有 78 個 CAG 重複擴增的全長 MJD 蛋白時，對於 TBH 所產生的氧化壓力較為敏感，細胞存活率顯著降低（Wen et al., 2003）。

三、淋巴細胞株之熱休克蛋白表現

在本研究中，我們檢查 SCA17 病患淋巴細胞株與年齡、性別配對的正常人淋巴細胞株，在不同處理狀況下的熱休克蛋白 HSPA5、HSPA8、HSPB1 的表現（圖五~圖八），發現在血清去除時，不論是否給予 TBH 處理，三位 SCA17 病患淋巴細胞株的 HSPA8 相對蛋白表現量，均較年齡、性別配對的正常人淋巴細胞株顯著增加。顯示表現 TBP-Q₄₄₋₅₅ 的細胞，在去血清的壓力下，會透過增加 HSPA8 的表現量，來因應細胞對抗去血清壓力的調節。HSPA8 又稱為 HSC70

(heat shock cognate protein 70)，在細胞未受到壓力時即持續表現，作為監護蛋白，幫助其他蛋白摺疊、組裝及運送新合成蛋白(Hartl and Hayer-Hartl, 2002)。HSPA8 的表現可受到氧化壓力或熱休克反應正向調節(Bernardini et al., 2004; Lo et al., 2004)，高表現 HSPA8 時亦能抑制高溫壓力所造成的細胞死亡(Belay and Brown, 2006)。本研究的結果顯示在淋巴細胞株中，SCA17 擴增的 polyQ 蛋白在細胞承受去血清的壓力時，會誘發較多的 HSPA8 表現。但另外兩種熱休克蛋白 HSPA5 與 HSPB1 表現則未檢測到明顯變化，可能因為未參與去血清的壓力反應，或者參與調節但反應發生在更早期或晚期，而未被偵測到。

四、誘導式 SCA17 細胞模式之建立

本篇研究亦成功建立 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 誘導式的細胞株。由圖九與圖十的 mRNA 與蛋白表現結果，得知 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白正確性及誘導表現之穩定性。帶有 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 重組基因的細胞於無誘導情形下，mRNA 與蛋白均有低表現的產生，顯示 Flp-In™ T-REX™ 的誘導系統調節不夠嚴謹，可能 TetR 蛋白未完全與啟動子結合，使基因抑制出現漏洞(leaky)，而有低表現的情形。另一方面，從圖十一與圖十二的螢光顯微鏡觀察，清楚看到

tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白表現於細胞內，並觀察到 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株中有少部分細胞產生融合蛋白聚集，而此聚集現象在許多 polyQ 疾病的相關研究中均有發現 (Perez et al., 1998)。故 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞內表現的擴增 polyQ 蛋白，極有可能因不正常摺疊而導致聚集發生。然而在此細胞模式中觀察到並非每顆細胞表現之 tNTBP-Q₅₄-EGFP 融合蛋白均會產生聚集現象，推測與細胞生理狀態或誘導表現時間有關。此細胞模式雖無大量蛋白聚集產生，但可能更貼近 SCA17 疾病早期帶有 polyQ 突變的 TBP 蛋白剛開始累積聚集的狀態，值得進行相關研究。

由次細胞蛋白質分群分析結果，則發現 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白主要位表現於細胞質，可能與此段基因片段上缺乏核定位序列 (nuclear localizational signal)，無法將此合成之蛋白運送至核內有關。然而在核蛋白的分群中亦發現有少量 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白表現，推測其原因可能有二，其一為進行次細胞蛋白質分群，離心完取出細胞質萃取液時，仍有少量溶液殘留或含有未破碎之細胞於底層含核蛋白的分群中，使得最後萃取核蛋白的溶液中，含有部分細胞質蛋白，未能完全分離細胞質蛋白與核蛋白；其二則為 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合蛋白在細胞內過度表現，可能與一些能進入核內的蛋白產生不正常結合，而共同被運送至核內。

五、誘導式 SCA17 細胞模式對藥物之敏感性

誘導式 SCA17 細胞株對藥物的敏感性測試(圖十四、圖十五)，顯示當處理 100 nM STS 或 50 μ M TBH 狀況下，tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株相對細胞存活率明顯降低，也就代表細胞表現 tNTBP-Q₅₄-EGFP 時，對於 STS 與 TBH 兩種藥物較為敏感，但另一 MG132 藥物則未影響細胞的存活率。故推測帶有 polyQ 擴增的 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白的表現，會影響細胞正常生理功能，因此在誘發細胞凋亡與引發氧化壓力的藥物處理後，更易使細胞走向死亡路徑。另外，此不完整 N 端帶有擴增的 TBP 蛋白是否比全長相同擴增的 TBP 蛋白更具毒性，而更易導致細胞死亡，則須進一步研究。

另一方面，候選藥物 VPA 為組蛋白去乙酰酶抑制物，可藉基因的去甲基化來誘導基因的表現 (Milutinovic et al., 2007)。本研究結果顯示先處理 100 μ M VPA，可提高低表現或誘導表現 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞的存活率，推論 VPA 可能具有降低 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白所引發細胞死亡的效果。另於老鼠中腦的研究中亦發現 VPA 的處理具有神經保護的效果 (Peng et al., 2005)，因此 VPA 藥物將可提供未來疾病治療上的參考。

六、誘導式 SCA17 細胞模式之熱休克蛋白表現

於本研究中，我們也檢視誘導式 SCA17 細胞株在不同處理狀況下的 HSPA5、HSPA8、HSPB1 (圖十五~圖十七)，發現 HSPB1 表現有明顯差異。在正常血清培養與血清去除狀況下，HSPB1 相對蛋白表現量皆在表現 tNTBP-Q₃-EGFP 與 tNTBP-Q₅₄-EGFP 蛋白的細胞株中顯著降低，並且在同步定量實驗中，也證實 HSPB1 的 mRNA 表現倍數有相同的降低趨勢，顯示 HSPB1 可能受到 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白表現的影響。HSPB1 被認為具有抑制 polyQ 所引發的細胞死亡的功能，在 SCA3 研究中，於病人的淋巴細胞株與表現突變蛋白的 SK-N-SH 的細胞中均發現 HSPB1 表現量有明顯下降 (Wen et al., 2003)。再者，最近的 SCA17 轉殖小鼠研究中，指出含有擴增 polyQ 的 TBP 蛋白會藉由加強與轉錄因子 TFIIB 的作用，使 TFIIB 在 *Hspb1* 啟動子上佔據情形降低，並觀察到 HSPB1 蛋白表現量受到負向調節 (Friedman et al., 2007)。因此由本研究中帶有 polyQ 擴增的 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株，其 HSPB1 相對蛋白與 mRNA 表現量下降情形，可推論帶有擴增的 polyQ TBP 蛋白確實會影響到 HSPB1 基因的轉錄表現。

另一方面，tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株帶有過短的 Q 可能也會干擾細胞正常功能，雖於細胞存活率實驗中，並未觀察到明顯細胞死亡，但在熱休克蛋白的研究中，則發現 HSPB1 表現量明顯降低，推測含有過短 Q 的不完整 N 端 TBP 亦可能會影響細胞的轉錄功能，對細胞產生某程度的傷害，但產生細胞毒害情形未如表現 tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株來得嚴重。

七、淋巴細胞株與誘導式 SCA17 細胞模式之差異

由於在兩種細胞模式中觀察到不同的熱休克蛋白受到調節表現，於 SCA17 病患淋巴細胞株中，發現 HSPA8 受到正向調節，然而在具有 polyQ 擴增的誘導式 SCA17 細胞模式，卻無此情形，反而觀察到 HSPB1 表現呈負向調節，推測可能與兩種細胞模式之間的差異有關，主要有三方面不同。第一，遺傳背景的差異，由於淋巴細胞株為不同個體所建立，因此含有不同的遺傳背景；誘導式 SCA17 細胞株則由 Flp-InTM T-REXTM 293 細胞株所建立，遺傳背景較為一致。第二，TBP 蛋白完整性的不同，淋巴細胞株表現完整的 TBP 蛋白；而誘導式 SCA17 細胞株所表現的是不完整 N 端的 TBP 蛋白。第三，不正常 TBP 蛋白表現時間的不同，SCA 17 病患淋巴細胞株為長時間持續表現不正常具有 polyQ 擴增的 TBP 蛋白；誘導

式 SCA17 細胞株則為誘導表現 2 天及 4 天，屬於短時間過度表現不正常 TBP 蛋白。

最後，綜合本篇研究，在淋巴細胞株與建立的誘導式 SCA17 細胞模式皆可觀察到帶有 polyQ 擴增的細胞於面對氧化壓力時，其耐受性均較差，因此氧化壓力可能參與 SCA17 致病機轉，值得繼續深入研究。此外，發現組蛋白去乙酰酶抑制劑 VPA 可增加帶有 polyQ 擴增細胞的存活率，將有利於找出 SCA17 治療策略的目標。另一方面，也檢視到 HSPA8 與 HSPB1 於帶有 polyQ 擴增的細胞中受到調節表現，推測可能與疾病發生有關，因此對於 HSPA8 與 HSPB1 的研究將可作為研究致病機轉與發展治療策略的參考。

陸、參考文獻

黃慧茹 (2007)。第十七型脊髓小腦運動失調症：遺傳檢測及發展生化暨酵母菌的藥物篩檢模式。國立臺灣師範大學生命科學系九十五年學年度碩士論文。

Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G (2003) Heat Shock Protein 70 Chaperone Overexpression Ameliorates Phenotypes of the Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Transgenic Mouse Model by Reducing Nuclear-Localized Mutant Androgen Receptor Protein. *J Neurosci* 23: 2203-2211.

Albers DS, Beal MF (2000) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J Neural Transm Suppl* 59:133-154.

Alonso I, Costa C, Gomes A, Ferro A, Seixas AI, Silva S, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I (2005) A novel H101Q mutation causes PKC γ loss in spinocerebellar ataxia type 14. *J Hum Genet* 50: 523-529.

Beal MF, Ferrante RJ (2004) Experimental therapeutics in transgenic mouse models of huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:373-384.

Belay HT, Brown IR (2006) Cell death and expression of heat-shock protein Hsc70 in the hyperthermic rat brain. *J Neurochem* 97 Suppl 1:116-119.

Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O'Kane CJ,

- Rubinsztein DC (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 15:433-442.
- Bernardini C, Fantinati P, Zannoni A, Forni M, Tamanini C, Bacci ML (2004) Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. *Mol Reprod Dev* 69:303-307.
- Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF (2001) Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of huntington's disease. *J Neurochem* 79:1246-1249.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646-653.
- Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF (1999) Oxidative stress in huntington's disease. *Brain Pathol* 9:147-163.
- Brusse E, de Koning I, Maat-Kievit A, Oostra BA, Heutink P, van Swieten JC (2006) Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): A new phenotype. *Mov Disord.* 2006 Mar;21(3):396-401.
- Burley SK, Roeder RG (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65:769-799.
- Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, Penney JB, Davies SW, Bates GP, Young AB (1999) Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:981-989.

- Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM, and Paulson H (1999) Analysis of the Role of Heat Shock Protein (Hsp) Molecular Chaperones in Polyglutamine Disease. *J Neurosci* 19:10338-10347.
- Chan HY, Warrick JM, Gray-Board GL, Paulson HL, Bonini NM (2000) Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9:2811-2820.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel J-, Cha J-J, Friedlander RM (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Chen CM, Lane HY, Wu YR, Ro LS, Chen FL, Hung WL, Hou YT, Lin CY, Huang SY, Chen IC, Soong BW, Li ML, Hsieh-Li HM, Su MT, Lee-Chen GJ (2005) Expanded trinucleotide repeats in the TBP/SCA17 gene mapped to chromosome 6q27 are associated with schizophrenia. *Schizophr Res* 78:131-136.
- Cordeiro Y, Lima LM, Gomes MP, Foguel D, Silva JL (2004) Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *J Biol Chem* 279:5346-5352.
- Cummings CJ, Zoghbi HY (2000) Fourteen and counting: Unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet* 9:909-916.
- Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestri R, Orr HT, Dillmann, WH, Zoghbi HY (2001) Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function

- in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 10:1511-1518.
- David G, Abbas N, Stevanin G, Duerr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Brice A (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17:65-70.
- De Michele G, Maltecca F, Carella M, Volpe G, Orio M, De Falco A, Gombia S, Servadio A, Casari G, Filla A, Bruni A (2003) Dementia, ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy: Phenotype spectrum in two italian families with spinocerebellar ataxia type 17. *Neurol Sci* 24:166-167.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW, Matson WR, Cooper AJL, Ratan RR, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ (2002) Therapeutic effects of cystamine in a murine model of huntington's disease. *J Neurosci* 22:8942-8950.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Duenas AM, Goold R, Giunti P (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129:1357-1370.
- Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in huntington's disease mice. *J Neurosci* 23:9418-9427.
- Ferrao-Gonzales AD, Robbs BK, Moreau VH, Ferreira A, Juliano L, Valente AP, Almeida FC, Silva JL, Foguel D (2005) Controlling

- β -amyloid oligomerization by the use of naphthalene sulfonates: trapping low molecular weight oligomeric species. *J Biol Chem* 280:34747-34754.
- Friedman MJ, Shah AG, Fang Z, Ward EG, Warren ST, Li S, Li X (2007) Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci* 10:1519-1528.
- Fujigasaki H, Martin JJ, De Deyn PP, Camuzat A, Deffond D, Stevanin G, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Dürr A, Brice A (2001) CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124:1939-1947.
- Gold BG, Voda J, Yu X, Gordon H (2004) The immunosuppressant FK506 elicits a neuronal heat shock response and protects against acrylamide neuropathy. *Exp Neurol* 187:160-170.
- Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 13:442-449.
- Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR (2006) Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342:184-190.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1858.

- Hernandez D, Hanson M, Singleton A, Gwinn-Hardy K, Freeman J, Ravina B, Doheny D, Gallardo M, Weiser R, Hardy J, Singleton A (2003) Mutation at the SCA17 locus is not a common cause of parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 9:317-320.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PAS, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA, Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2041-2046.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieria-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23: 391-392.
- Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Dürr A, Zühlke C, Bürk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38: 184-190.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Dürr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14: 285-291.

- Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L (2002) Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 8:143-149.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Kakizuka A (1994) CAG expansions in a novel gene for machado-joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-228.
- Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183-201.
- Kiang JG (2004) Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res* 14:450-459.
- Knuckey NW, Palm D, Primiano M, Epstein MH, Johanson CE (1995) N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 26:305-310; discussion 311.
- Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* 275:8772-8778.
- Kobayashi Y, Sobue G (2001) Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res Bull* 56:165-168.

- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miike T, Naito H, Ikuta F, Tsuji S (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 6: 9-13.
- Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: A new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8:2047-2053.
- Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21: 379-384.
- Lasek K, Lencer R, Gaser C, Hagenah J, Walter U, Wolters A, Kock N, Steinlechner S, Nagel M, Zuehlke C, Nitschke M-, Brockmann K, Klein C, Rolfs A, Binkofski F (2006) Morphological basis for the spectrum of clinical deficits in spinocerebellar ataxia 17 (SCA17). *Brain* 129:2341-2352.
- Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, Martin JL, Dillmann WH, Woolf CJ (1999) A role for HSPB1 in sensory neuron survival. *J Neurosci* 19:8945-8953.
- Lo W, Liu K, Liao I, Song Y (2004) Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress Chaperones* 9:332-343.
- Maltecca F, Filla A, Castaldo I, Coppola G, Fragassi NA, Carella M, Bruni A, Coccozza S, Casari G, Servadio A, De Michele G (2003)

- Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17. *Neurology* 61:1441-1443.
- Manto M (2005) The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 4:2-6.
- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E, Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY, Ashizawa T (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26: 191-194.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28:560-571.
- Mitsui K, Nakayama H, Akagi T, Nekooki M, Ohtawa K, Takio K, Hashikawa T, Nukina N (2002) Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1alpha and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J Neurosci* 22:9267-9277.
- Nakamura K, Jeong S, Uchihara T, Anno M, Nagashima K, Nagashima T, Ikeda S, Tsuji S, Kanazawa I (2001) SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet* 10:1441-1448.
- Ohtsuka K, Hata M (2000) Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. *Int J Hyperthermia* 16:231-245.
- Ohtsuka K, Suzuki T (2000) Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull* 53:141-146.

- Okazawa H (2003) Polyglutamine diseases: A transcription disorder? *Cell Mol Life Sci* 60:1427-1439.
- Ona VO, Li M, Vonsattel JPG, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li X, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JJ, Friedlander RM (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of huntington's disease. *Nature* 399:263-267.
- Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW, Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4:221-226.
- Peng GS, Li G, Tzeng NS, Chen PS, Chuang DM, Hsu YD, Yang S, Hong JS (2005) Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 134:162-169.
- Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143:1457-1470.
- Perez-Severiano F, Ríos C, Segovia J (2000) Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of huntington's disease. *Brain Res* 862:234-237.
- Perez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Ríos C, Segovia J (2002) Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the huntington's disease mutation. *Brain Res* 951:36-42.

- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5355-5358.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen X, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozoco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Sahba S (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14:269-276.
- Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11:1107-1117.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36:585-595.
- Reid SJ, Rees MI, van Roon-Mom WMC, Jones AL, MacDonald ME, Sutherland G, During MJ, Faull RLM, Owen MJ, Dragunow M, Snell RG (2003) Molecular investigation of TBP allele length: A SCA17 cellular model and population study. *Neurobiol Dis* 13:37-45.
- Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang D (2004) Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: Potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 89:1358-1367.

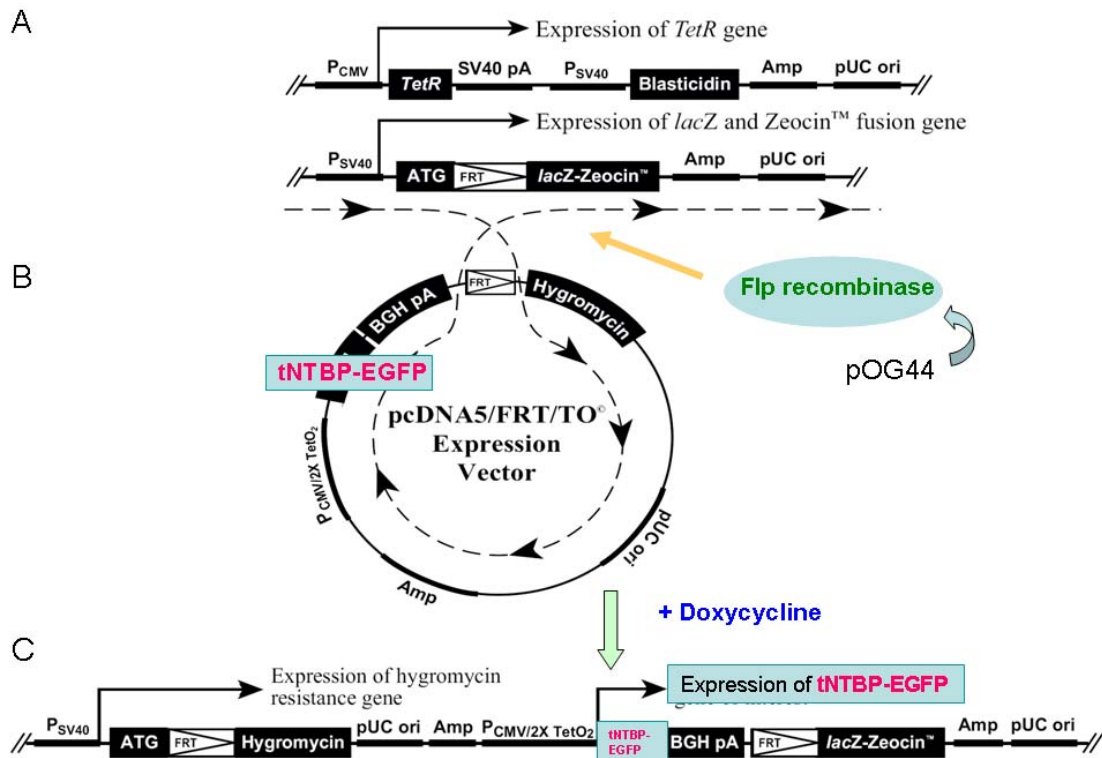
- Rolfs A, Koeppen AH, Bauer I, Bauer P, Buhlmann S, Topka H, Schöls L, Riess O (2003) Clinical features and neuropathology of autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA17). *Ann Neurol* 54:367-375.
- Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Deodoglu A, Escudero M, Flemington E, Azizkhan-Clifford J, Ferrante RJ, Ratan RR (2003) Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4281-4286.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, Schöls L, Laccone F, Herms J, Rechsteiner M, Riess O, Landwehrmeyer GB (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: Redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51:302-310.
- Seipel K, Georgiev O, Gerber H, Schaffner W (1994) Basal components of the transcription apparatus (RNA polymerase II, TATA-binding protein) contain activation domains: Is the repetitive C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II a "portable enhancer domain"? *Mol Reprod Dev* 39:215-225.
- Silveira I, Miranda C, Guimarães L, Moreira M-, Alonso I, Mendonça P, Ferro A, Pinto-Basto J, Coelho J, Ferreirinha F, Poirier J, Parreira E, Vale J, Januário C, Barbot C, Tuna A, Barros J, Koide R, Tsuji S, Holmes SE, Margolis RL, Jardim L, Pandolfo M, Coutinho P, Sequeiros J (2002) Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: A small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 59:623-629.

- Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Lehrach H, Wanker EE (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10:1307-1315.
- Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Gouttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemainque A, Ruberg M, Brice A, Durr A (2004) Mutation in the catalytic domain of protein kinase C gamma and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol* 61: 1242-1248.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu Y, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in drosophila. *Nature* 413:739-743.
- Stevanin G, Fujigasaki H, Lebre A, Camuzat A, Jeannequin C, Dode C, Takahashi J, San C, Bellance R, Brice A, Durr A (2003) Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain* 126:1599-1603.
- Trushina E, McMurray CT (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 145:1233-1248.
- van de Warrenburg BP, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FA, Pearson PL, Knoers NV, Kremer HP, Sinke RJ (2003) Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family. *Neurology* 61: 1760-1765.

- Wagstaff MJ, Collaco-Moraes Y, Smith J, De Bellerocche JS, Coffin RS, Latchman, DS (1999) Protection of neuronal cells from apoptosis by HSPB1 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J Biol Chem* 274: 5061-5069.
- Warrick JM, Chan HYE, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 23:425-428.
- Wellington CL, Hayden MR (2000) Caspases and neurodegeneration: On the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clin Genet* 57:1-10.
- Wen F, Li Y, Tsai H, Lin C, Li C, Liu C, Lii C, Nukina N, Hsieh M (2003) Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett* 546:307-314.
- Wu YR, Lin HY, Chen CM, Gwinn-Hardy K, Ro LS, Wang JC, Li SH, Hwang JC, Fang K, Hsieh-Li HM, Li ML, Tung LC, Su MT, Lu KT, Lee-Chen GJ (2004) Genetic testing in spinocerebellar ataxia in Taiwan: expansions of trinucleotide repeats in SCA8 and SCA17 are associated with typical Parkinson's disease. *Clin Genet* 65:209-214.
- Wu YR, Fung HC, Lee-Chen GJ, Gwinn-Hardy K, Ro LS, Chen ST, Hsieh-Li HM, Lin HY, Lin CY, Li SN, Chen CM (2005) Analysis of polyglutamine-coding repeats in the TATA-binding protein in different neurodegenerative diseases. *J Neural Transm* 112:539-546.
- Wullner U (2003) Genes implicated in the pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Drugs Today* 39:927-937.

- Wytenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo A, Rubinsztein DC (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 11:1137-1151.
- Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Kikuchi S, Tashiro K (2003) Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch Neurol* 60: 1749-1751.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69.
- Zuhlke C, Hellenbroich Y, Dalski A, Kononowa N, Hagenah J, Vieregge P, Riess O, Klein C, Schwinger E (2001) Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. *Eur J Hum Ggenet* 9:160-164.

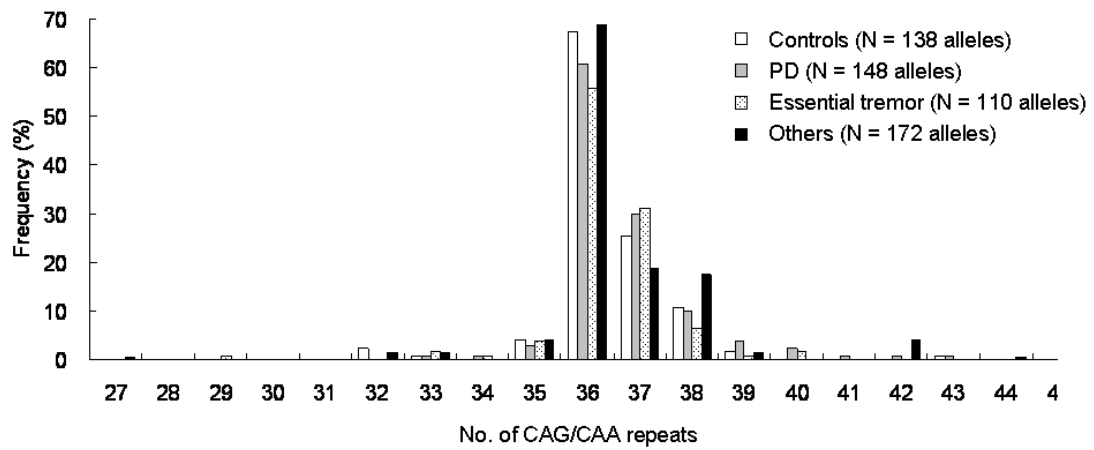
柒、附錄圖表



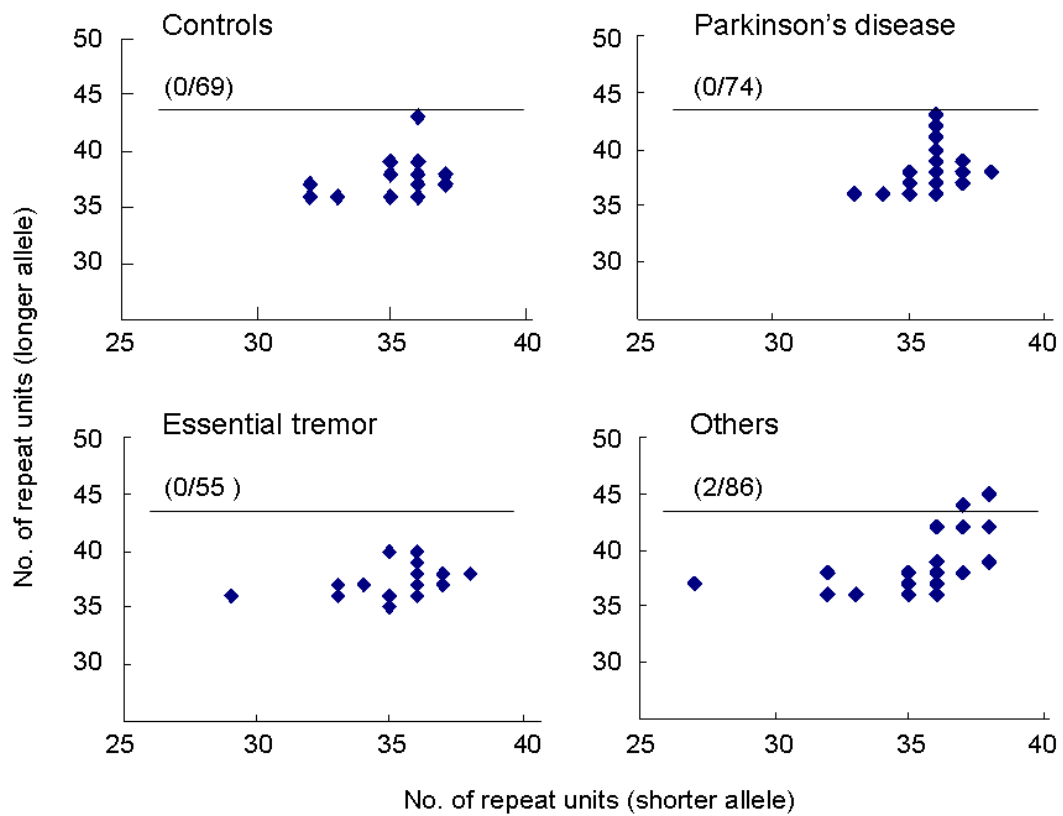
圖一、建立誘導式 SCA17 細胞模式流程圖。(A) Flp-InTM T-REXTM 293 細胞株含有 FRT (Flp Recombinase Target) 序列與 TetR 基因可調控下游基因表現，另有 Zeocin 及 Blastcidin 抗生素篩選基因。

(B) 構築不完整 N 端 TBP (tNTBP) 及 EGFP 融合基因片段於含有相同 FRT 序列 pcDNA5/FRT/TO 表現載體，再與表現重組酵素 (Flp Recombinase) 的 pOG44 載體共轉移至 Flp-In T-Rex 誘導系統細胞中。

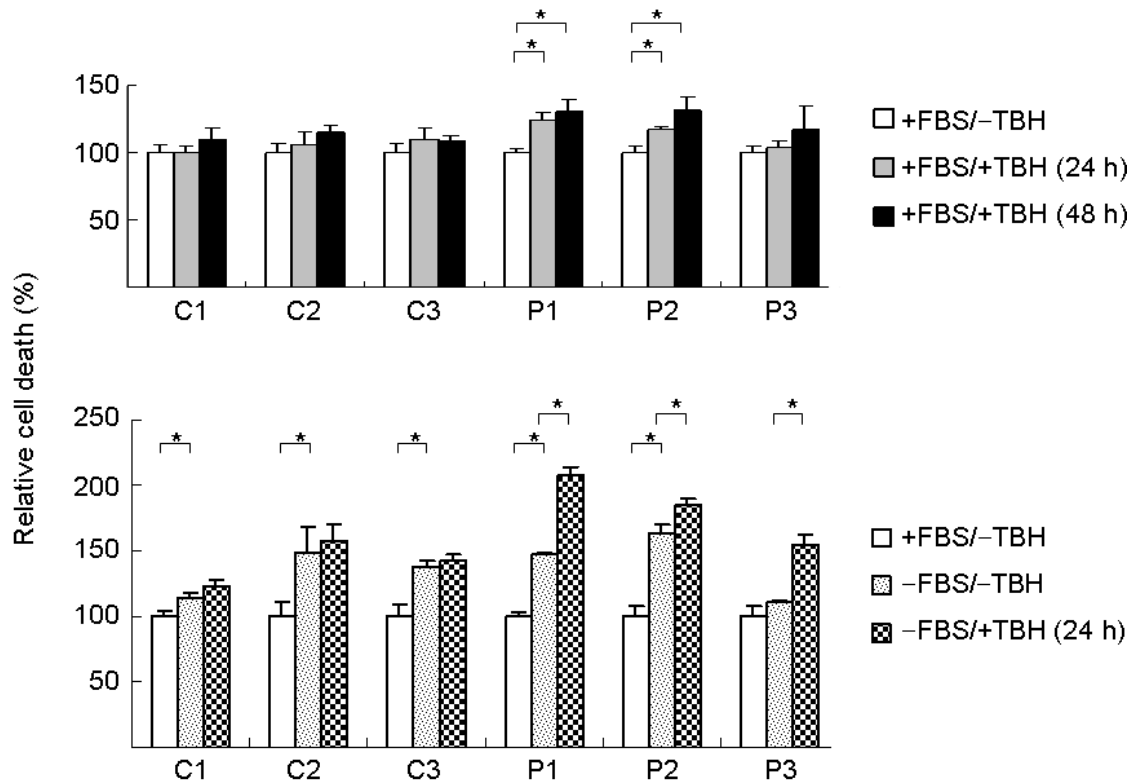
(C) 加入 tetracycline 類似物 doxycycline 誘導 tNTBP-EGFP 融合基因表現。



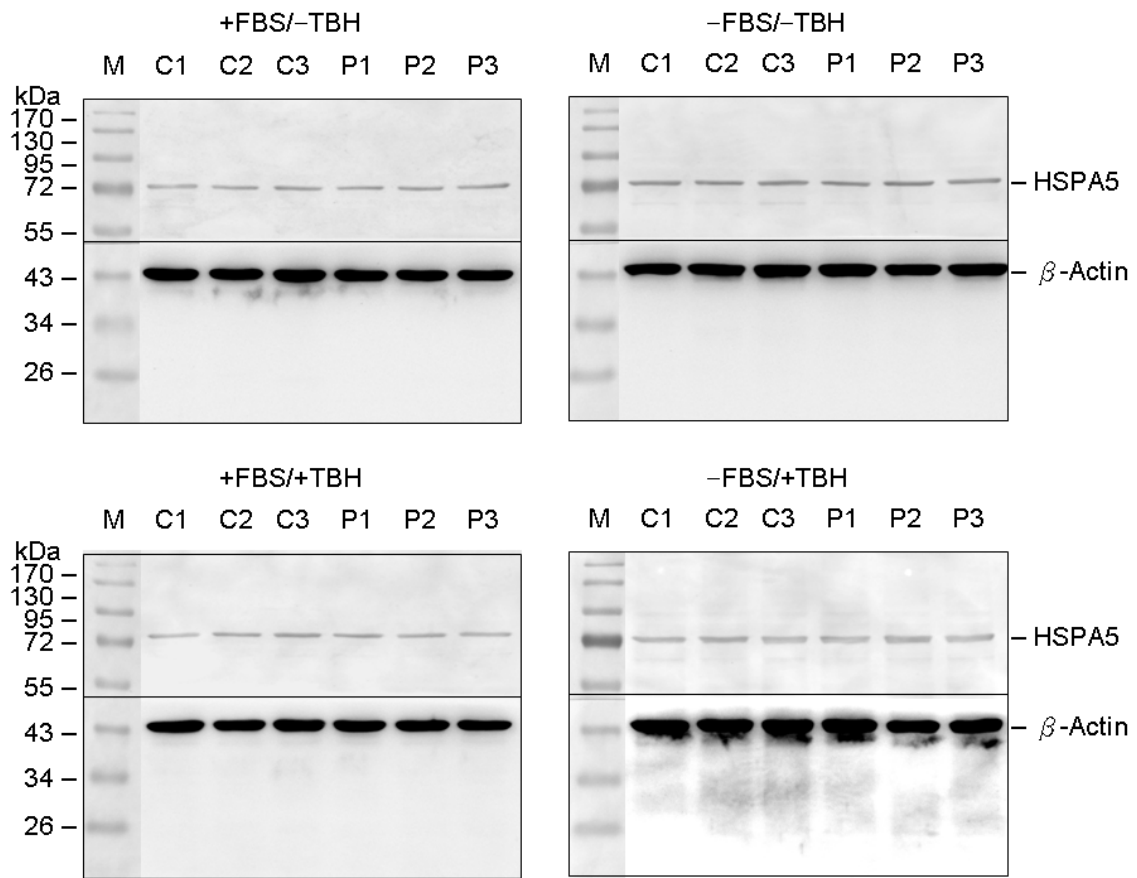
圖二、*TBP* 等位基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數頻率分布圖。檢測之臺灣人族群包括正常人 (Controls)、帕金森氏症病患 (PD)、原發性顫抖症 (Essential tremor) 及其它神經退化性疾病患者或家屬 (Others)。



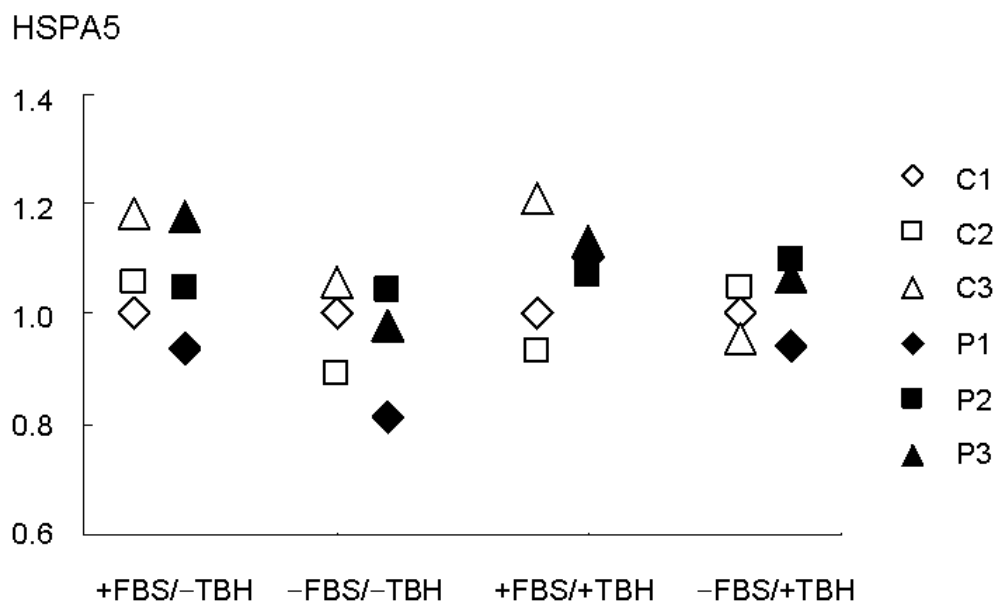
圖三、*TBP* 基因 CAG/CAA 三核苷酸重複次數基因型分佈圖。檢測之臺灣人族群包括正常人 (Controls)、帕金森氏症病患 (PD)、原發性顫抖症 (Essential tremor) 及其它神經退化性疾病患者或家屬 (Others)。



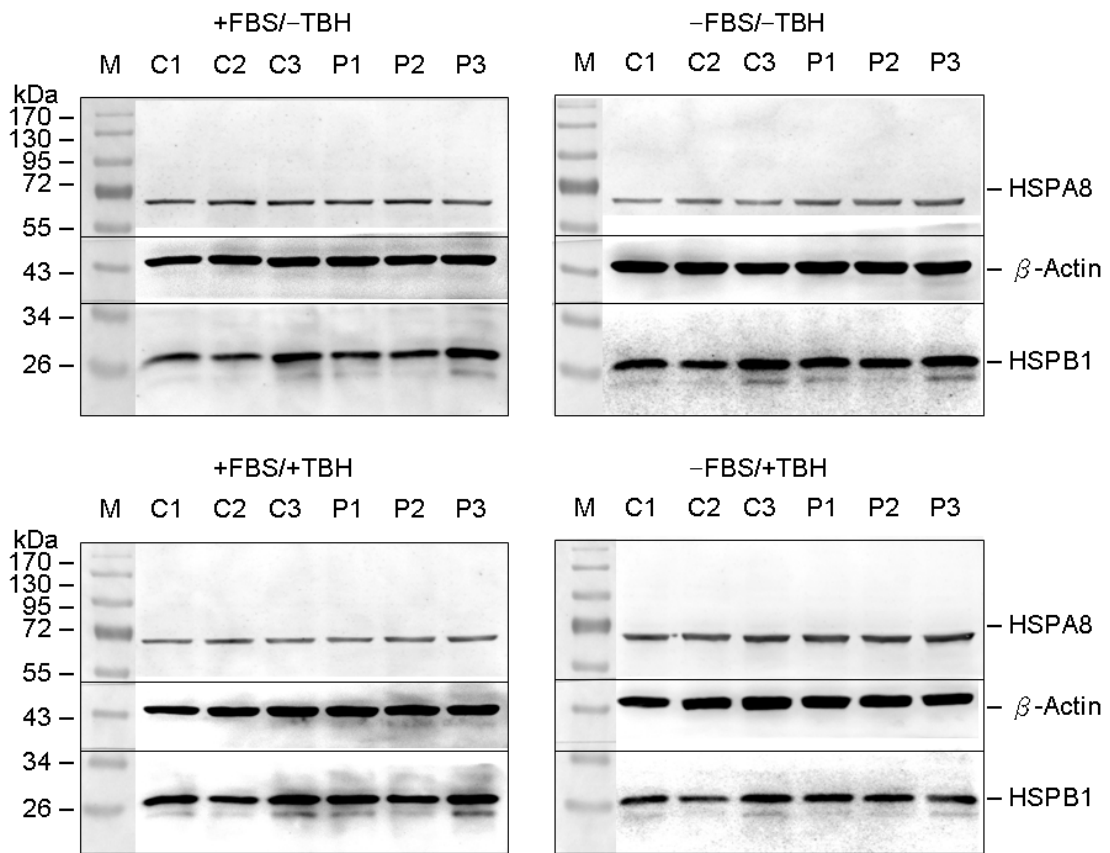
圖四、淋巴細胞株對血清去除與 TBH 處理之相對細胞死亡率。三位正常人 (C1、C2、C3) 與三位 SCA17 病患 (P1、P2、P3) 淋巴細胞株，進行 10% 血清 (+FBS) 或去血清 (-FBS) 處理，以及在此兩種處理狀況下，分別進行 0 μ M TBH (-TBH) 或 10 μ M TBH (+TBH) 處理 24 小時或 48 小時後，利用 Trypan blue 排除檢測法計算細胞死亡率。其結果以 10% 血清與 0 μ M TBH 處理為 100% 後，進行標準化，計算相對細胞死亡率。 (*, $P < 0.05$)。



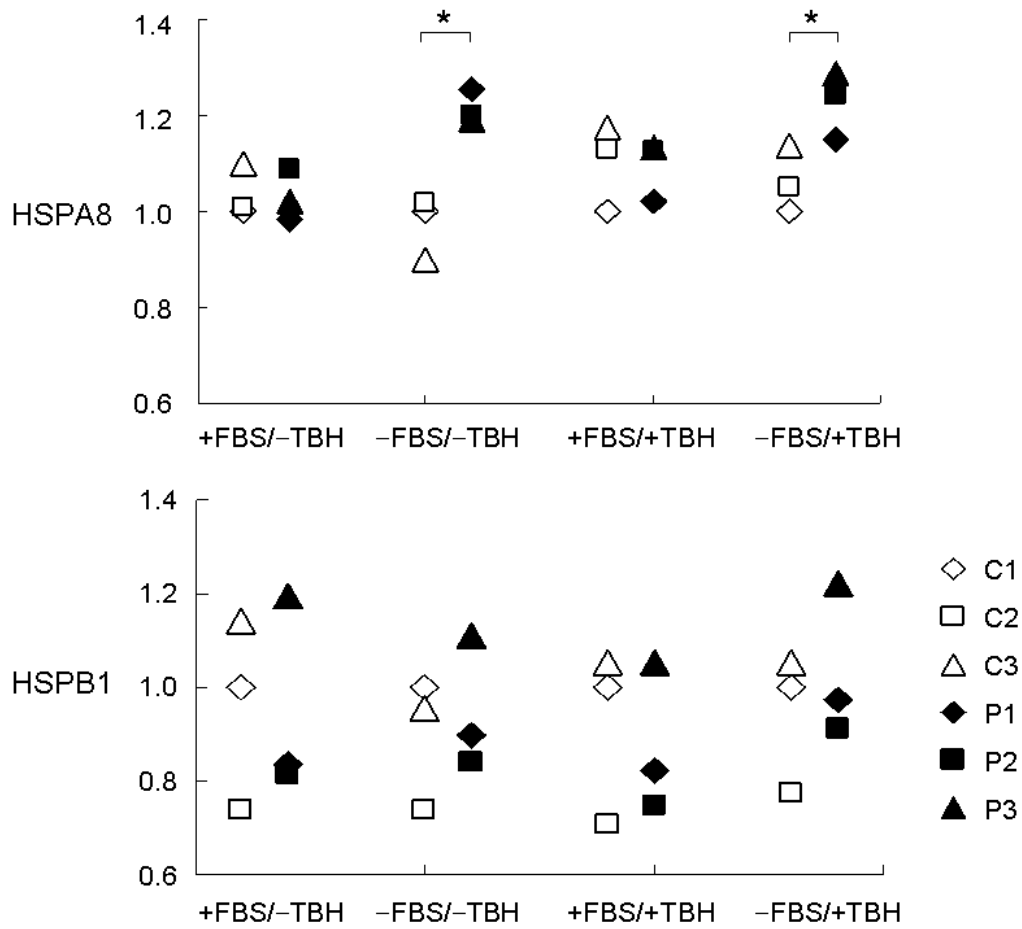
圖五、淋巴細胞株之 HSPA5 蛋白表現情形。三位正常人 (C1、C2、C3) 與三位 SCA17 病患 (P1、P2、P3) 的淋巴細胞株，進行 10% 或去血清 (+FBS/-FBS)、0 μ M 或 10 μ M TBH (-TBH/+TBH) 處理後，利用西方轉漬法，以 GRP78 抗體偵測 HSPA5 蛋白表現的情形。 β -Actin 蛋白的表現作為各樣品 loading 量的對照。



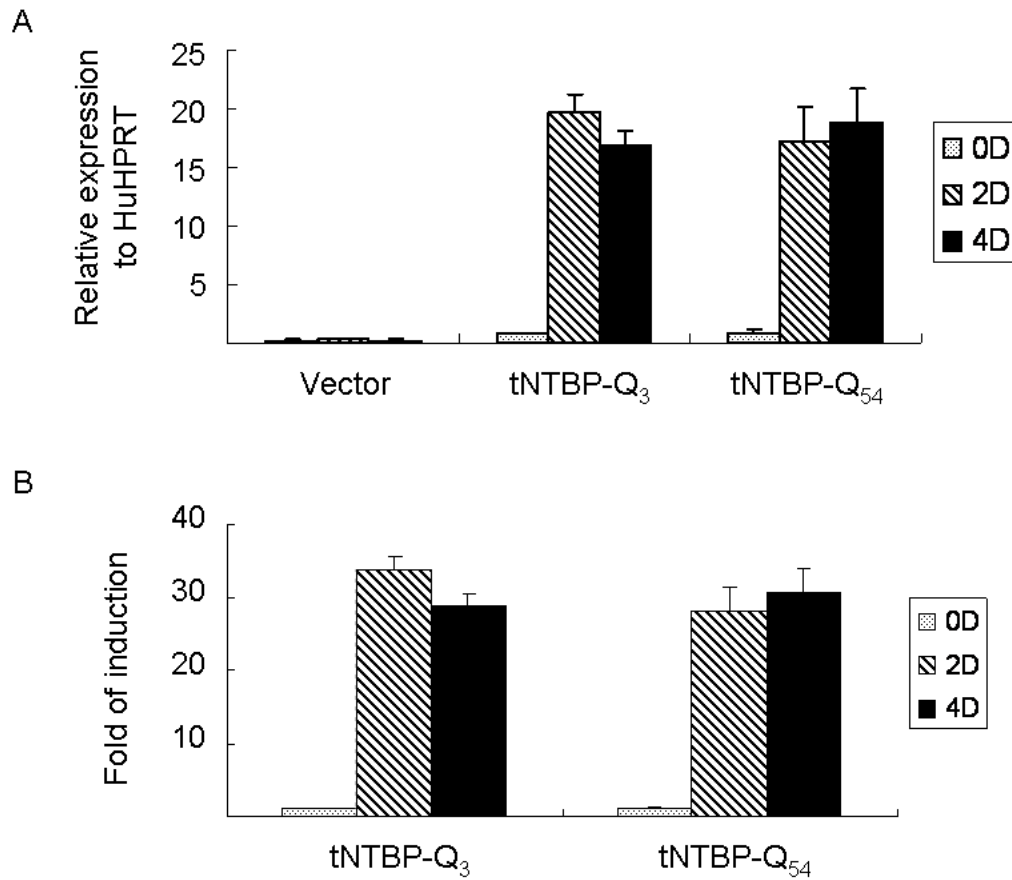
圖六、淋巴細胞株之 HSPA5 相對蛋白表現量化圖。其結果為圖五經 AlphaImager 軟體分析後，以淋巴細胞株 C1 之 HSPA5 對 β -Actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量。



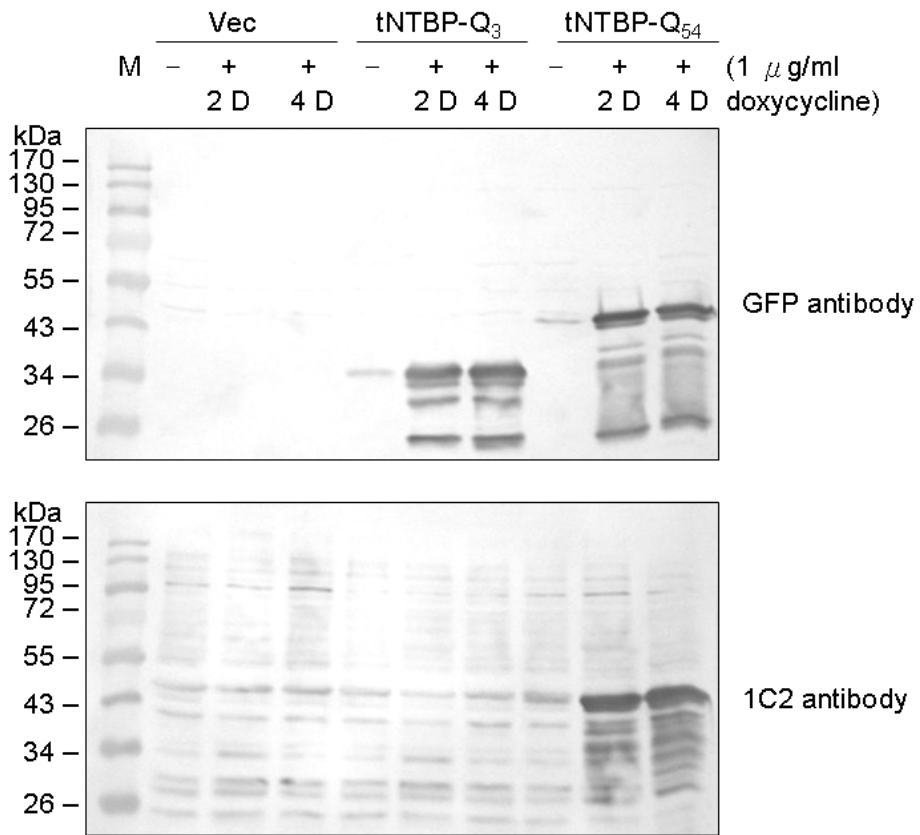
圖七、淋巴細胞株之 HSPA8 與 HSPB1 蛋白表現情形。三位正常人 (C1、C2、C3) 與三位 SCA17 病患 (P1、P2、P3) 的淋巴細胞株，進行 10% 或去血清 (+FBS/-FBS)、0 μ M 或 10 μ M TBH (-TBH/+TBH) 處理後，利用西方轉漬法，以抗體 HSC70 與 HSPB1 偵測 HSPA8 與 HSPB1 蛋白表現的情形。 β -Actin 蛋白的表現作為各樣品 loading 量的對照。



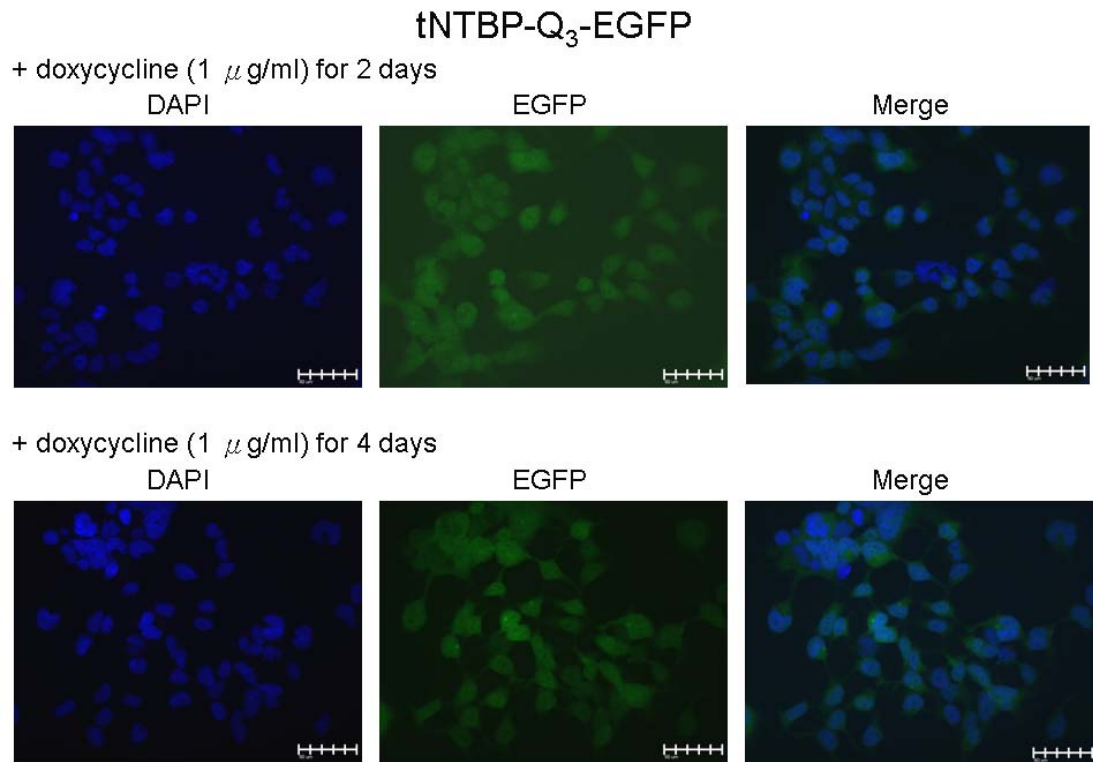
圖八、淋巴細胞株之 HSPA8 及 HSPB1 相對蛋白表現量化圖。其結果為圖七經AlphaImager 軟體分析後，以淋巴細胞株 C1 之 HSPA8 或 HSPB1 對 β -Actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量。（*， $P < 0.05$ ）。



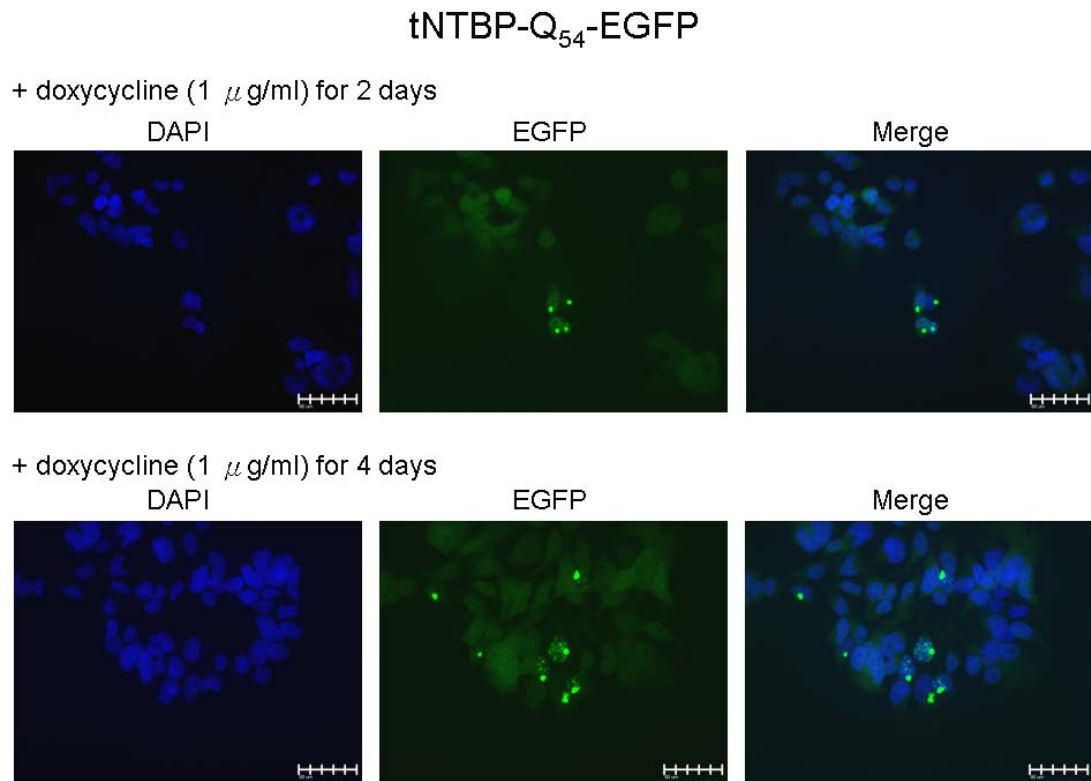
圖九、誘導式 SCA17 細胞模式之 tNTBP-EGFP mRNA 誘導表現情形。(A) Vector、tNTBP-Q₃、tNTBP-Q₅₄ 細胞於無誘導 (0D) 與誘導 2 天及 4 天 (2D、4D) 後，利用同步定量 PCR，偵測內生性 *HuHPRT* 及 *TBP* (包括內生性及外源性 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP) 的 mRNA 表現。其結果為 *TBP* 相對於 *HuHPRT* mRNA 表現量。(B) 扣除內生性 *TBP* 表現量後，以無誘導當作 1.0 倍，計算 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 融合基因的 mRNA 誘導表現倍數。



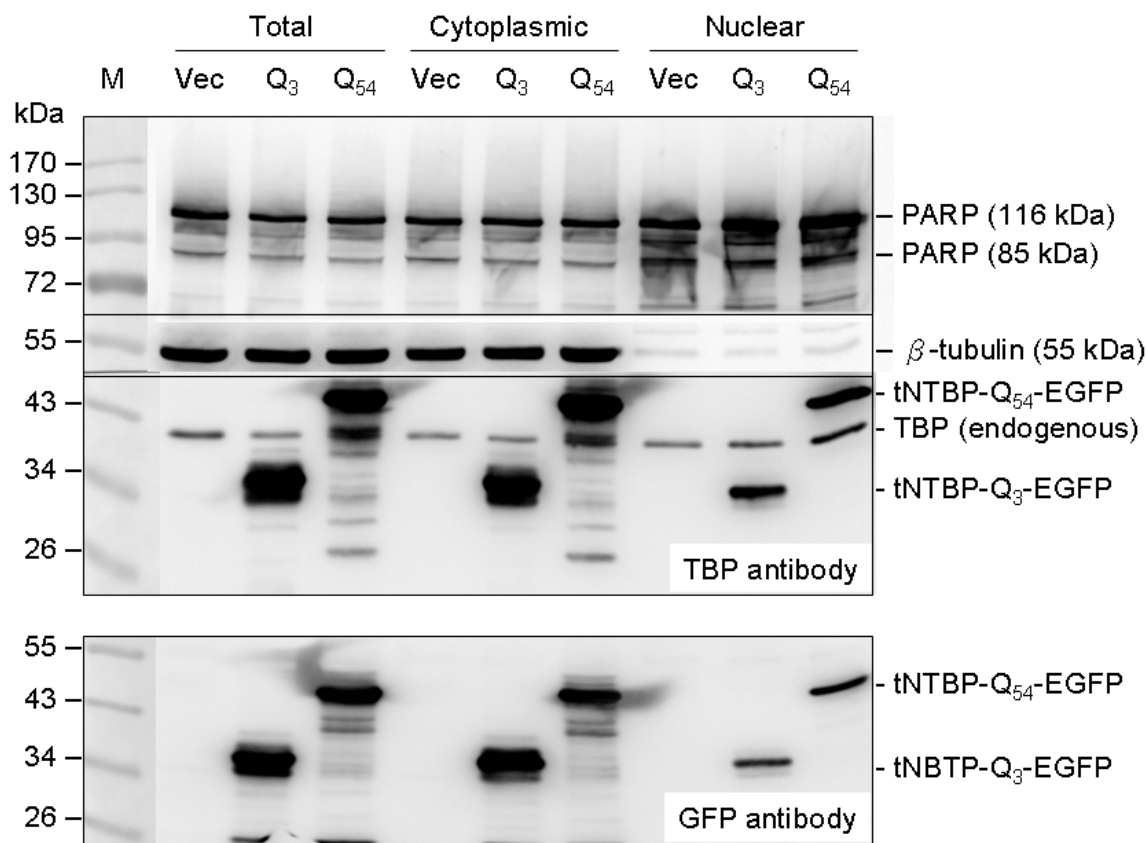
圖十、誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白表現情形。
 Vector、tNTBP-Q₃、tNTBP-Q₅₄ 細胞於無誘導 (0D) 與誘導 2 天及 4 天 (2D、4D) 後，利用西方轉漬法，以 GFP (上)、1C2 (下) 抗體偵測 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白表現情形。



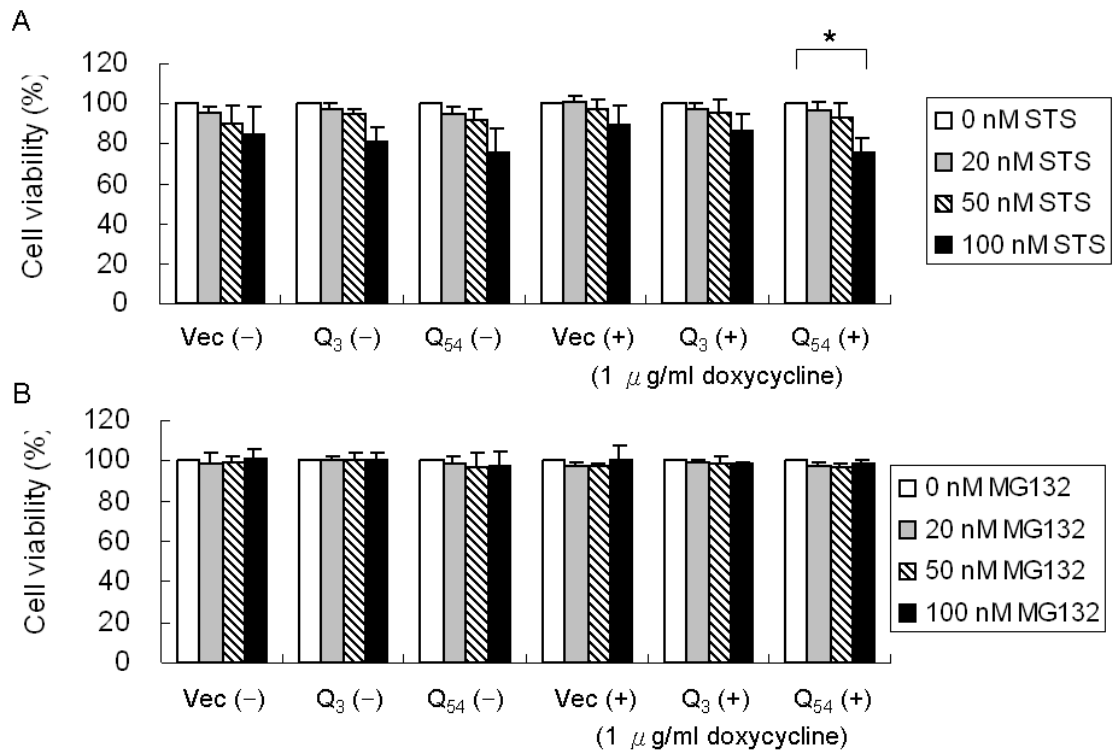
圖十一、tNTBP-Q₃-EGFP 細胞株之融合綠螢光蛋白表現情形。tNTBP-Q₃-EGFP 細胞於誘導 2 天及 4 天後，利用螢光顯微鏡觀察 tNTBP-Q₃-EGFP 融合蛋白在細胞內表現位置與情形。左：DAPI 染劑標示細胞核；中：不完整 N 端 TBP 及綠螢光融合蛋白 (tNTBP-Q₃-EGFP)；右：兩者重疊圖。



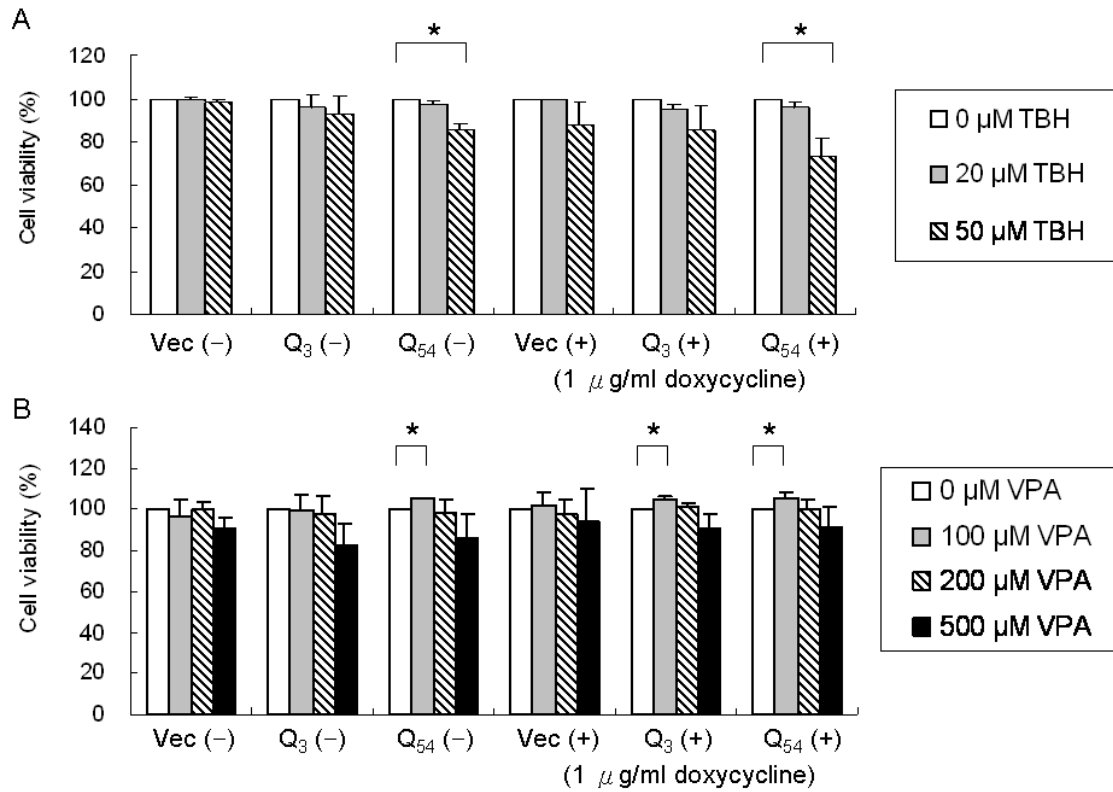
圖十二、tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞株之融合綠螢光蛋白表現情形。tNTBP-Q₅₄-EGFP 細胞於誘導 2 天及 4 天後，利用螢光顯微鏡觀察 tNTBP-Q₅₄-EGFP 融合蛋白在細胞內表現位置與情形。左：DAPI 染劑標示細胞核；中：不完整 N 端 TBP 及綠螢光融合蛋白 (tNTBP-Q₅₄-EGFP)；右：兩者重疊圖。



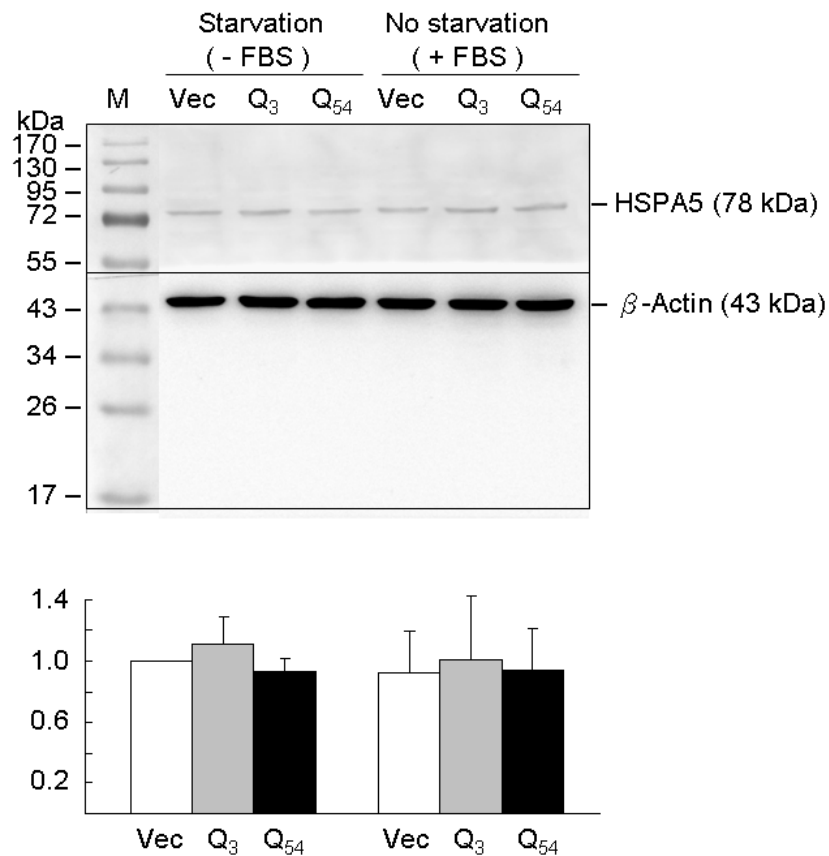
圖十三、誘導式 SCA17 細胞模式 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白次細胞分群分析。Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞誘導 2 天後，進行次細胞蛋白質分群，分離出細胞質蛋白 (Cytoplasmic) 與核蛋白 (Nuclear) 及未分離的總蛋白質 (Total)。再利用西方轉漬法，以 TBP 與 GFP 抗體偵測 tNTBP-Q_{3/54}-EGFP 蛋白在細胞質及細胞核的分佈情形。PARP 抗體為核蛋白標記，116 kDa 為不活化態，85 kDa 為活化態； β -tubulin 為細胞質蛋白標記。



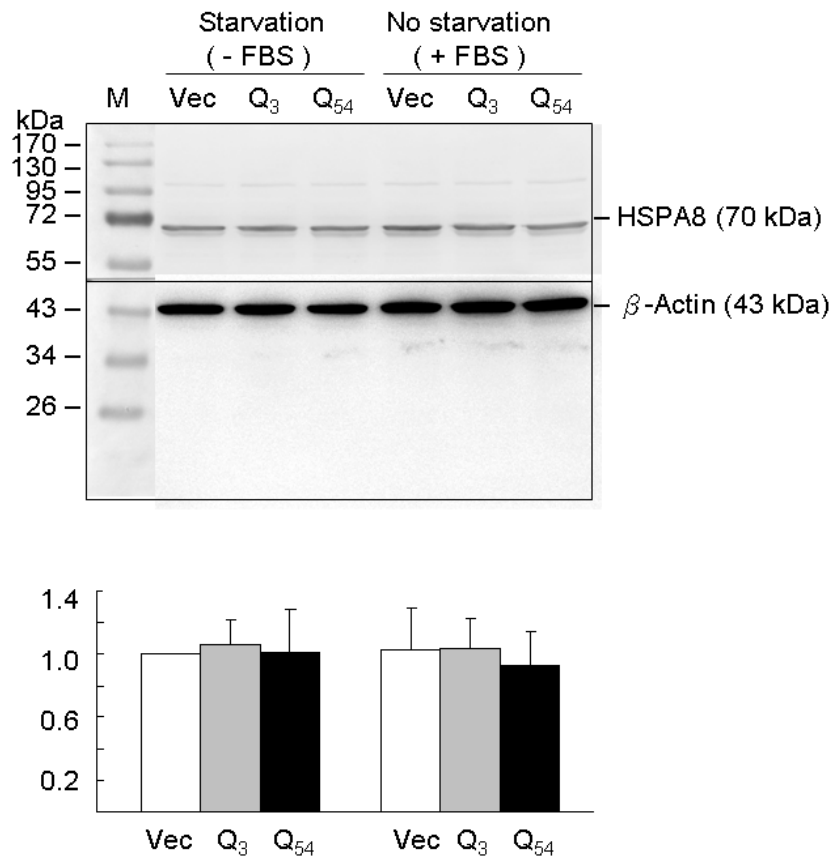
圖十四、誘導式 SCA17 細胞處理 STS 與 MG132 之相對細胞存活率。Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於無誘導 (-) 及誘導 24 小時 (+) 後，進行 0 nM、20 nM、50 nM、100 nM STS (A) 或 0 nM、20 nM、50 nM、100 nM MG132 (B) 處理 24 小時後，再利用 WST-1 細胞增生檢測法計算細胞存活率。其結果以各株 0 nM STS 或 0 nM MG132 處理為 100% 後，進行標準化，計算相對細胞存活率。(*, $P < 0.05$)。



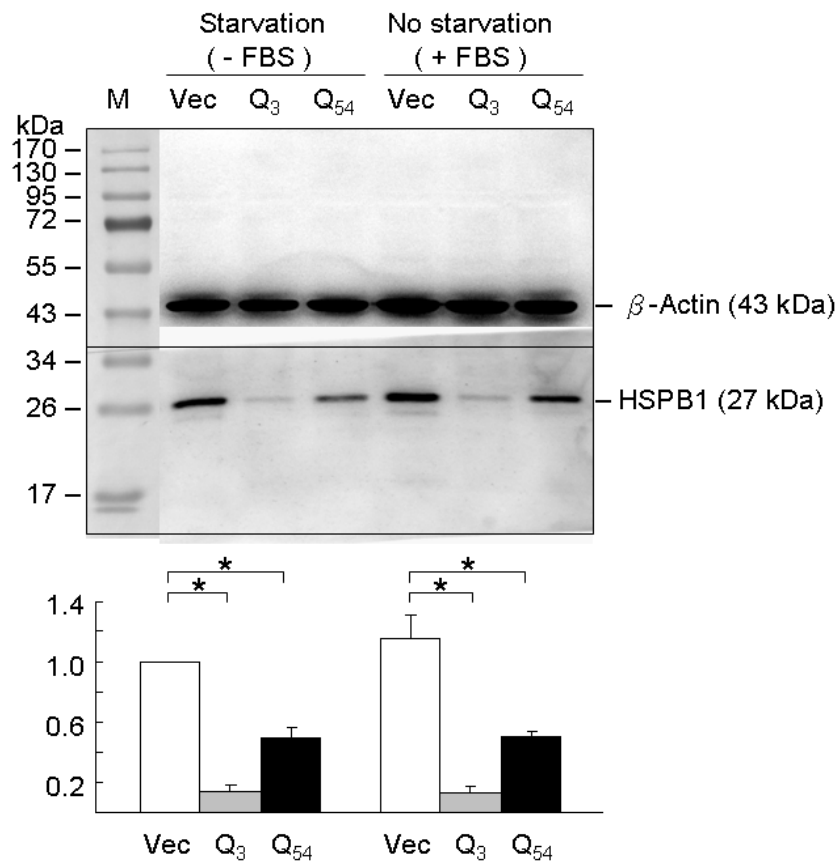
圖十五、誘導式 SCA17 細胞處理 TBH 與 VPA 之相對細胞存活率。(A) Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於無誘導 (-) 及誘導 24 小時 (+) 後，進行 0 μM、20 μM、50 μM TBH 處理 24 小時後，利用 MTT 細胞增生檢測法計算細胞存活率。(B) Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞先處理 0 μM、100 μM、200 μM、500 μM VPA 48 小時後，進行無誘導 (-) 及誘導 48 小時 (+)，再利用 MTT 細胞增生檢測法計算細胞存活率。其結果以各株 0 μM TBH 與 0 μM VPA 處理為 100% 後，進行標準化，計算相對細胞存活率。(*, $P < 0.05$)。



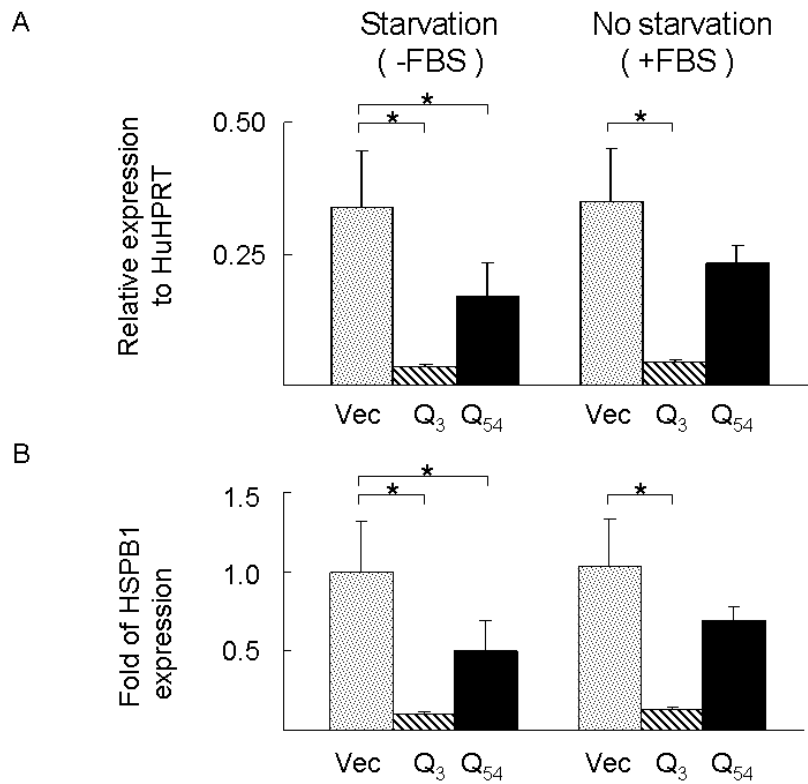
圖十六、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPA5 蛋白表現情形與量化圖。Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於誘導 24 小時後，進行 0% 與 10% 血清 (-FBS/+FBS) 處理 24 小時，利用西方轉漬法，以抗體 GRP78 偵測 HSPA5 蛋白表現情形。其結果並經 AlphaImager 軟體分析，以 Vector 的 0% 血清處理之 HSPA5 對 β -actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量。



圖十七、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPA8 蛋白表現情形與量化圖。Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於誘導 24 小時後，進行 0% 與 10% 血清 (-FBS/+FBS) 處理 24 小時，利用西方轉漬法，以抗體 HSC70 偵測 HSPA8 蛋白表現情形。其結果並經 AlphaImager 軟體分析，以 Vector 的 0% 血清處理之 HSPA8 對 β -actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量。



圖十八、誘導式 SCA17 細胞模式之 HSPB1 蛋白表現情形與量化圖。Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於誘導 24 小時後，進行 0% 與 10% 血清 (-FBS/+FBS) 處理 24 小時，利用西方轉漬法，以抗體 HSPB1 偵測 HSPB1 蛋白表現情形。其結果並經 AlphaImager 軟體分析，以 Vector 的 0% 血清處理之 HSPB1 對 β -actin 蛋白表現強度的相對比值當作 1.0 後，進行標準化，計算相對蛋白表現量。



圖十九、誘導式 SCA17 細胞模式之 *HSPB1* mRNA 表現情形。(A) Vector (Vec)、tNTBP-Q₃-EGFP (Q₃)、tNTBP-Q₅₄-EGFP (Q₅₄) 細胞於誘導 24 小時後，進行 0% 與 10% 血清 (-FBS/+FBS) 處理 24 小時，利用同步定量 PCR，偵測 *HSPB1* 及 *HuHPRT* 的 mRNA 表現，其結果為 *HSPB1* 相對於 *HuHPRT* mRNA 表現量。(B) 將 Vector 的 0% 血清處理之 *HSPB1* 相對於 *HuHPRT* mRNA 表現量，當作 1.0 倍，進行標準化，計算 *HSPB1* 的 mRNA 表現倍數。

表一、正常與 SCA17 淋巴細胞株年齡性別配對與 *TBP* 等位基因 CAG/CAA 重複次數

Lymphoblastoid cell lines	Age/sex	Diagnosis	Repeat no.
95CT277 (C1)	23/F	NC	36/38
95CT209 (C2)	70/F	NC	36/36
95CT167 (C3)	68/M	NC	36/36
CC3313 (P1)	28/F	SCA17	36/ 55
CC4179 (P2)	78/F	SCA17	33/ 46
CC4524 (P3)	80/M	SCA17	37/ 44

註：NC，normal control 正常人；SCA，spinocerebellar ataxia 脊髓小腦運動失調症患者。

表二、TBP 等位基因 CAG/CAA 三核苷重複次數之頻率

CAG No.	Controls		PD		Tremor		Others	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
27	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.7
28	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
29	0	0.0	0	0.0	1	0.9	0	0.0
30	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
31	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
32	3	2.5	0	0.0	0	0.0	2	1.4
33	1	0.8	1	0.8	2	1.9	2	1.4
34	0	0.0	1	0.8	1	0.9	0	0.0
35	5	4.1	4	3.1	4	3.8	6	4.2
36	82	67.2	79	60.8	59	55.7	99	68.8
37	31	25.4	39	30.0	33	31.1	27	18.8
38	13	10.7	13	10.0	7	6.6	25	17.4
39	2	1.6	5	3.8	1	0.9	2	1.4
40	0	0.0	3	2.3	2	1.9	0	0.0
41	0	0.0	1	0.8	0	0.0	0	0.0
42	0	0.0	1	0.8	0	0.0	6	4.2
43	1	0.8	1	0.8	0	0.0	0	0.0
44	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.7
45	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.7
Total	138		148		110		172	
Mean	36.4		36.7		36.4		36.6	
Std	1.2		1.3		1.2		1.8	

表三、TBP 等位基因 CAG/CAA 三核苷重複次數擴增之定序結果

Subject	Repeat no.	Repeat sequence	Diagnosis
H1803	45	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₈ (CAA) ₁ (CAG) ₁	OPMD
H1900	44	(CAG) ₃ (CAA) ₃ (CAG) ₆ CAACAGCAA(CAG) ₂₇ (CAA) ₁ (CAG) ₂	TICS

註：OPMD，oculopharyngeal muscular dystrophy，眼咽肌肉失調症；TICS，tic syndrome，妥瑞氏症、抽動症。