

國立台灣師範大學生命科學系 碩士論文

台灣族群帕金森氏症Leucine-Rich

Repeat Kinase 2 (LRRK2)

基因變異的分子功能研究

Molecular Characterization of LRRK2

Variations in Taiwanese Parkinson's

Disease

研究生：張文騰

Wen-Teng Chang

指導教授：李桂楨博士

Guey-Jen Lee-Chen

中華民國一〇〇年六月

國立臺灣師範大學學位論文授權書

本授權書所授權之論文為授權人在國立臺灣師範大學

理學院生命科學研究所 99 學年度第 二 學期取得碩士(Master)學位之論文。

論文題目：台灣族群帕金森氏症 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) 基因變異的分子功能研究

指導教授：李桂楨

授權事項：

- 一、 授權人同意非專屬無償授權本校將上列論文全文資料以微縮、光碟、數位化或其他方式進行重製作為典藏之用。本校在上述範圍內得再授權第三人進行重製。
- 二、 授權人同意非專屬無償授權本校及國家圖書館將前條典藏之資料收錄於資料庫，並以電子形式透過單機、網際網路、無線網路或其他傳輸方式，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、瀏覽、下載、傳輸、列印等利用。本校得將上述權利再授權于第三者。
- 三、 論文全文電子檔上載網路公開時間：

■自 2013 年 8 月 30 日始公開。

授權人姓名： 張文騰 (請親筆正楷簽名)

學號：698430477

註：1. 本授權書須列印並簽署兩份，一份裝訂於紙本論文書名頁，一份繳至圖書館辦理離校手續。

2. 授權事項未勾選者，分別視同「同意」與「即時公開」。

中 華 民 國 100 年 8 月 30 日

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	VI
Abstract.....	VII
圖表目錄.....	VIII
壹、緒論.....	1
一、帕金森氏症.....	1
(一)臨床病徵.....	1
(二)神經病理學.....	2
(三)病因學.....	2
二、帕金森氏症的遺傳分析.....	4
三、 <i>LRRK2</i> 基因.....	5
(一) <i>LRRK2</i> 的構造、表現與功能.....	6
(二) <i>LRRK2</i> 基因變異與帕金森氏症.....	6
貳、研究目的.....	8
參、研究材料與方法.....	9
一、R1441H、R1628P、G2385R對 <i>LRRK2</i> 蛋白在細胞內的位置及 合成的影響.....	9
(一) EGFP標記的 <i>LRRK2</i> cDNA質體建構.....	9
(二)細胞培養.....	10

(三)基因轉染(Transfection).....	10
(四)西方轉漬法(Western blot).....	11
(五)共軛焦顯微鏡觀察.....	12
(1)觀察LRRK2- EGFP融合蛋白於細胞中的表現.....	12
(2)觀察LRRK2- EGFP與粒腺體重疊情形.....	13
(3)觀察LRRK2- EGFP與溶小體重疊情形.....	13
(4)觀察LRRK2- EGFP與內質網重疊情形.....	13
二、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成聚集	
的情形.....	14
(一) α -synuclein cDNA選殖.....	14
(二) EGFP標計的LRRK2 cDNA質體建構.....	14
(三)細胞培養.....	15
(四)基因共轉染(co-transfection).....	15
(五)細胞免疫螢光染色及螢光顯微鏡觀察.....	16
(六)活細胞影像儀觀察.....	17
三、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成二元	
體的情形.....	17
(一) Myc-His標記的LRRK2 質體建構.....	17
(二) 基因轉染及西方轉漬分析.....	18

(三) LRRK2-Myc-His與LRRK2-EGFP形成二元體的分析.....	18
四、R767H、S885N、R1441H、G2019S等突變的LRRK2 蛋白與	
ARHGEF7 蛋白結合測試	19
(一) ARHGEF7 cDNA選殖	19
(二) LRRK2 與ARHGEF7 蛋白的免疫共沉澱分析.....	20
肆、結果	22
一、R1441H、R1628P、G2385R對LRRK2 蛋白在細胞內的位置及	
合成的影響.....	22
(一) EGFP 標記的 LRRK2 cDNA 選殖.....	22
(二) 西方轉漬法分析R1441H、R1628P、G2385R對LRRK2 合	
成的影響.....	22
(三) LRRK2-EGFP的共軛焦螢光顯微鏡觀察	23
二、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成聚集	
的情形.....	23
(一) α -synuclein cDNA 選殖.....	23
(二) EGFP標記的LRRK2/G2019S cDNA質體.....	23
(三) α -synuclein 免疫螢光染色及共軛焦螢光顯微鏡觀察	24
(四)活細胞影像儀觀察突變的LRRK2 形成聚集的情形	24

三、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成二元體的情形.....	24
(一) Myc-His標記的LRRK2 cDNA.....	25
(二) Myc-His標記的LRRK2 cDNA表現	25
(三) LRRK2-Myc-His、LRRK2-EGFP蛋白的二元化情形.....	26
四、R767H、S885N、R1441H、G2019S等突變的LRRK2 蛋白的與ARHGEF7 蛋白的結合情形	26
(一) ARHGEF7 cDNA選殖	26
(二) LRRK2 與ARHGEF7 蛋白間交互的作用	27
伍、討論	28
一、R1441H、R1628P、G2385R對LRRK2 蛋白在細胞內的位置及合成的影響.....	28
二、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成聚集的情形.....	29
三、R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2 形成二元體的情形.....	30
四、R767H、S885N、R1441H、G2019S等突變的LRRK2 蛋白與ARHGEF7 蛋白的交互作用	31
陸、參考文獻	33

柒、附錄圖表42

摘要

PARK8 基因座的 *LRRK2* (全名 *leucine-rich repeat kinase 2*) 基因，其突變會導致體染色體顯性的帕金森氏症。*LRRK2* 蛋白具有多個功能區域，於神經系統、大部份器官及淋巴細胞等都有表現。新穎的 R767H、S885N 變異及已報導過的 R1441H 變異，是本實驗室在臺灣帕金森氏症患者發現的突變點，R1628P 和 G2385R 兩變異則是華人帕金森氏症的危險因子。本論文首先建構 EGFP 標記的野生型及 R1441H、R1628P、G2385R 變異的 *LRRK2* 質體(含 S1647T、M2397T 多型性)，送到 HEK-293T 細胞中表現，經共軛焦顯微鏡觀察、西方轉漬分析研究，顯示上述變異對 *LRRK2* 蛋白在細胞內的位置及合成皆無受到影響。其次選殖 α -synuclein cDNA，與 R767H、S885N、R1441H、G2019S (白種人常見，作為對照)突變的 *LRRK2* 質體共轉染入 SK-N-SH 細胞，經細胞免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡觀察，顯示野生型 *LRRK2* 廣泛分佈在細胞質並與 α -synuclein 有些微連繫。突變的 R767H、S885N、R1441H、G2019S 亦主要分佈在細胞質，R1441H 和 G2019S 的 *LRRK2* 容易形成不含 α -synuclein 且鄰近細胞核的聚集。進一步的表現上述 *LRRK2* 質體於 HEK-293T 細胞二至六天後，螢光顯微鏡觀察及定量統計結果顯示 R1441H 和 G2019S 較野生型的 *LRRK2* 顯著地容易誘導更多的包涵體。最後，選殖 V5 標記的 ARHGEF7 cDNA，並建構不含 S1647T、M2397T 多型性的 Myc-His 標記的 *LRRK2* 質體，共轉染入 HEK-293T 細胞，進行免疫共沉澱與 GTP 結合能力試驗的分析，結果發現 S885N、R1441H、G2019S 等突變影響 *LRRK2* 蛋白與 ARHGEF7 的交互作用。

關鍵字: 帕金森氏症、神經退化性疾病、震顫素。

Abstract

Mutations in PARK8 associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) have been shown to be the leading cause of autosomal dominant Parkinson's disease (PD). The multidomain LRRK2 is expressed ubiquitously, including the central nervous system and various organs. Previously novel R767H, S885N and reported R1441H were found in Taiwanese PD patients, in addition to R1628P and G2385R risk factors in ethnic Chinese populations. In the first part of this study, EGFP-tagged wild type, R1441H, R1628P and G2385R LRRK2 constructs (with S1647T and M2397T SNPs) were prepared for transient expression in HEK-293T cells. Western blot analysis and fluorescence microscopy examination revealed that neither localization nor processing of LRRK2 was affected by R1441H, R1628P and G2385R variations. Secondly, α -synuclein cDNA was cloned and co-transfected with the EGFP-tagged wild type or mutant (R767H, S885N, R1441H, G2019S) LRRK2 constructs in SK-N-SH cells. Confocal microscopy examination revealed that wild-type LRRK2 was widespread cytoplasmic and partially in association with α -synuclein. The distribution of R767H and S885N proteins were also mainly in cytoplasm. In contrast, both R1441H and G2019S (included as an aggregation control) LRRK2 mutants formed α -synuclein-negative perinuclear aggregates in a smaller, but still appreciable, proportion of cells, in addition to cytoplasmic distribution. Fluorescent microscopy examination and quantitation of the number of cells with LRRK2-EGFP fluorescent aggregates out of the transfected HEK-293T cell population further revealed that R1441H and G2019S both induced significant more inclusions as compared to wild-type LRRK2. Finally, V5-tagged ARHGEF7 cDNA was cloned and co-expressed with the Myc-tagged wild type or mutant (R767H, S885N, R1441H, G2019S) LRRK2 constructs in HEK-293T cells. Co-immunoprecipitation assay revealed that S885N, R1441H and G2019S reduced interaction between LRRK2 and ARHGEF7.

Key Word: Parkinson's disease, neurodegenerative disease, dardarin.

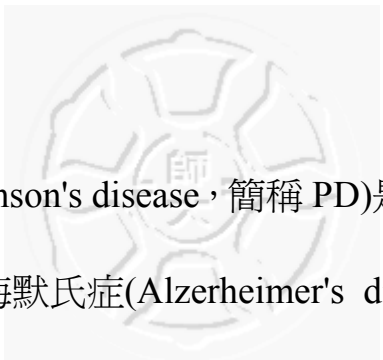
圖表目錄

圖一、LRRK2蛋白結構及基因突變。.....	42
圖二、EGFP及Myc-His標記的LRRK2 cDNA質體。.....	43
圖三、R1441H、R1628P、G2385R變異的LRRK2-EGFP重組質體的 構築。.....	44
圖四、Myc-His標記的 α -synuclein cDNA質體。.....	45
圖五、G2019S變異的LRRK2-EGFP重組質體的構築。.....	46
圖六、V5-His標記的ARHGEF7 cDNA質體。.....	47
圖七、R1441H、R1628P、G2385R變異的LRRK2-EGFP重組質體的 限制酶圖譜分析。.....	48
圖八、LRRK2-EGFP融合蛋白的西方轉漬分析。.....	49
圖九、共軛焦顯微鏡觀察LRRK2-EGFP融合基因在HEK-293T細胞內 表現(A)，及其與粒線體(B)、溶小體(C)、內質網(D)重疊情形。....	50
圖十、 α -synuclein-Myc-His重組質體的限制酶圖譜分析。.....	51
圖十一、G2019S突變的LRRK2-EGFP重組質體的限制酶圖譜分析。	52
圖十二、共軛焦顯微鏡觀察LRRK2-EGFP融合基因在SK-N-SH細胞 內與 α -synuclein免疫螢光染色重疊情形。.....	53
圖十三、活細胞影像儀觀察LRRK2-EGFP融合基因在HEK-293T細胞 內蛋白聚集情形。.....	54

圖十四、LRRK2-Myc-His重組質體的限制酵素圖譜分析及Myc-His tag定序圖。	55
圖十五、LRRK2-Myc-His融合蛋白的西方轉漬分析。	56
圖十六、LRRK2-Myc-His與LRRK2-EGFP形成二元體的分析。	57
圖十七、ARHGEF7 cDNA重組質體的限制酶圖譜分析。	58
圖十八、ARHGEF7 與LRRK2 蛋白的免疫共沉澱分析。	59
表一、定點突變的PCR引子對。	60

壹、緒論

一、帕金森氏症



帕金森氏症(Parkinson's disease, 簡稱 PD)是第二常見的神經退化性疾病，僅次於阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)，此病症最早在1817年由英國醫師 James Parkinson 所描述，故後來以其姓名命名。當時對 PD 症狀描述為一種震顫性麻痺(shaking palsy)，包括軀體四肢顫抖、僵硬，及行動緩慢等，但不清楚其病理機制。

(一)臨床病徵

帕金森氏症平均發病年齡約在 60 歲，臨床主要的病徵有靜止性震顫(resting tremor)、僵直(rigidity)、行動遲緩(bradykinesia)、步伐不穩(postural instability)等(Conley and Kirchner, 1999)。病患靜止性震顫頻率為每秒四到七次，通常會在休息時發生，常是罹病初期的表徵。肢體僵直的症狀常由肢體近端開始發展，動作過程花費的力氣較平常人大，軀幹旋轉能力變差。有行動遲緩症狀的病患，其自主動作的執行變慢且維持動作出現困難，動作的速度範圍與振幅都會降低。而步伐不穩是指病患在嘗試站立或轉身時，無法維持平衡因而容易跌倒(Marjama-Lyons and Koller, 2001)。

(二)神經病理學

PD 病患主要的病理特徵是多巴胺神經元(dopaminergic neuron)在中腦黑質之緻密區(substantia nigra pars compacta，簡稱 SNpc)與其他腦幹神經核有退化死亡的現象，因而造成黑質紋狀體路徑(nigrostriatal pathway)的多巴胺(dopamine)分泌不足而引起臨床症狀(Dauer and Przedborski, 2003)。這些多巴胺神經元是基底核(basal ganglia)重要的組成份子，基底核位於腦部，其功能為負責人體的微調及協調運動。

除了 SNpc 處會有多巴胺神經元死亡的病理特徵外，在部分偶性發 PD 病患的腦檢體中，亦發現有一種嗜伊紅性的細胞質內蛋白質包涵體(proteinacious cytoplasmic inclusions)，在神經元突起處呈鈎錘絲狀的構造分佈，稱之為 Lewy neuritis，有時則在神經元的細胞核周圍形成球狀的 Lewy body (Gibb and Lees, 1991)。這些包涵體分佈在 PD 病患 SNc 處殘存的多巴胺神經元中，主要成分為 α -synuclein、ubiquitin 與 neurofilament (Conley and Kirchner, 1999)。

(三)病因學

多數的 PD 病患屬於偶發型(sporadic)，確切病因及病理機制尚不

明確，少數的家族遺傳性 PD 則與基因突變有關(Farrer, 2006)。年齡增加為 PD 重要的危險因子，即隨著個體年齡的增加，其盛行率亦逐漸升高(Chen et al., 2001)。病理學的研究也顯示，在 50 ~ 90 歲的正常個體，其腦部黑質細胞數量會以每十年會減少百分之 4.7 至 6.0% 的速度老化(Gibb and Lees, 1991)。雖然年齡是 PD 最重要的危險因子，但僅由腦部黑質細胞的老化仍不足引起 PD，可能還有遺傳及環境等因子的參與而導致。隨著 PD 研究的進展，目前最被接受的 PD 病因理論為遺傳與環境產生交互作用下的多因子理論：罹患 PD 的個體先天遺傳了某些基因的缺陷或多型性(polymorphism)，使得這些個體對特定環境因子的感受性較大，而較易引起黑質多巴胺神經元的退化，最後導致 PD (Bertram et al., 2005; Schapira, 2006)。

PD 的遺傳現象最早可追溯到 1880 年，Gowers 發現其所治療的病人中，約有 15% 的 PD 病人其家族中也有患病的親屬。在多個 PD 家族研究，也發現兄弟姐妹中罹患 PD 的風險與正常人相比，有顯著的提升(Lazzarini et al., 1994; Payami et al., 1994)。依據國外研究文獻顯示，約有 5~10% 的 PD 病人具有家族遺傳的現象，遺傳的方式有體染色體顯性(autosomal dominant)及體染色體隱性(autosomal recessive)兩種。家族遺傳的患者發病時通常較年輕，屬於早發型帕金森氏症

(EOPD，發病年齡 < 50) (Elbaz et al., 1999)，其病程進展較快，且臨床上及病理上的特徵都較不典型(Bertram et al., 2005)。

與PD相關的環境因素中最為人所熟知的就是毒品合成時的副產物MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)。在 1983 年數名使用含MPTP的吸毒者，出現類似帕金森氏症候群(parkinsonism)的典型症狀。病理學的檢驗也發現患者中腦黑質緻密區內多巴胺神經元大量死亡，而且紋狀體內多巴胺的量明顯降低，這些病理特徵也與PD相符(Langston, 1987)。MPTP的代謝物MPP⁺ (1-methy-4-phenyl-pyridinium ion)進入多巴胺神經元後，會抑制粒線體產生ATP，使多巴胺神經元缺乏能量而死亡(Snyder and D'Amato, 1986)。另外，銅、鐵等重金屬因能催化多巴胺的氧化作用，增加自由基的形成及神經元內的氧化壓力，加速中腦黑質神經元的死亡，故被認為和PD的成因有關(Montgomery, 1995)。台灣地區的病例-對照組研究，結果顯示巴拉刈及殺蟲劑/除草劑與台灣人罹患PD呈現正相關(Liou et al., 1997)。

二、帕金森氏症的遺傳分析

遺傳基因在帕金森氏症的致病機轉上佔有重要的角色(Lev and Melamed, 2001)。研究人員針對PD家族成員，利用隨機的微衛星標記

(microsatellite maker)進行的遺傳連鎖分析，找出和家族性PD相關的基因座(locus)，且部分的致病基因已被確認，包括 4q21-23 的 α -synuclein (*SNCA*, PARK1) (Polymeropoulos et al., 1997)、6q25.2-27 的Parkin (*PRKN*, PARK2) (Kitada et al., 1998)、4p14 的ubiquitin carboxy-terminal esterase L1 (*UCHL1*, PARK5) (Leroy et al., 1998)、1p35-p36 的PTEN-induced putative kinase 1 (*PINK1*, PARK6) (Hatano et al., 2004)、1p36 的Parkinson disease protein 7 (*DJ-1*, PARK7) (Bonifati et al., 2003)、12q12 的leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*, PARK8) (Zimprich et al., 2004)、1p35-p36 的ATPase type 13A2 (*ATP13A2*, PPARK9) (Di Fonzo et al., 2007)、2p12 的HtrA serine peptidase 2 (*HTRA2*, PARK13) (Strauss et al., 2005)、22q13.1的phospholipase A2, group VI (*PLA2G6*, PARK14) (Paisan-Ruiz et al., 2009)以及22q12-q13的F box protein 7 (*FBXO7*, PARK15) (Di Fonzo et al., 2009)等(Belin and Westerlund, 2008; Hardy et al., 2009)。

三、*LRRK2* 基因

PARK8 *LRRK2* 基因於 2002 年被定位於 12p11.2-q13.1 (Funayama et al., 2002)。之後，Paisan-Ruiz 選殖了此基因並命名為 Dardarin (Paisan-Ruiz et al., 2004)，意即震顫之意。*LRRK2* 基因是目前引起帕

金森氏症病中體染色體顯性遺傳的重要基因。

(一) LRRK2 的構造、表現與功能

LRRK2 基因全長約 144 kb，轉譯出的 LRRK2 蛋白由 2527 個胺基酸組成，分子量約 285 kDa (Paisan-Ruiz et al., 2004)。LRRK2 蛋白屬於 ROCO protein family 中的一員，結構上有 6 個重要的功能區域(domains)，分別為 ANK (Ankyrin repeat)、LRR (Leucine-rich repeat)、ROC (Ras of complex protein)、COR (C terminal of ROC)、MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase)以及 WD40 等(圖一)。這 6 個功能區域使得 LRRK2 蛋白有多種功能，包括與受質的結合、蛋白質的磷酸化、蛋白質與蛋白質之間的交互作用等 (Giasson and Van Deerlin, 2008)。

(二) *LRRK2* 基因變異與帕金森氏症

自 *LRRK2* 基因被報導至今以來，*LRRK2* 基因的變異在不同人種已陸續被發表。根據前人統計，具有顯性遺傳帕金森氏症家族史的病患中，被發現有 *LRRK2* 基因變異的有 13%，而在偶發型帕金森氏症病患中則為 5% (Berg et al., 2005; Mata et al., 2006; Taylor et al., 2006)。

LRRK2 基因變異中的 G2019S，為白種人常見的 *LRRK2* 基因突變

(Lesage et al., 2008)。但在亞洲人種包括韓國、新加坡以及台灣族群的研究中，卻罕有發現此點的變異(Tan et al., 2005; Choi et al., 2008; Lin et al., 2008)，顯示PD病患中有*LRRK2* 基因變異在不同人種會有不小的差異。

目前 *LRRK2* 變異點已被報導與亞洲族群相關聯，分別有 P755L (Wu et al., 2006)、R1441H、R1628P、G2385R (Mata et al., 2005)等。之後的研究顯示，G2385R 變異為亞洲人種罹患 PD 的危險因子 (Funayama et al., 2007; Li et al., 2007; Tan et al., 2007; An et al., 2008)，且未在亞洲以外的人種中被報導(Di Fonzo et al., 2006)。R1628P 變異為華人特有罹患 PD 的危險因子，包含了台灣及新加坡族群，但目前此變異並未在日本及印度族群中發現(Tan et al., 2008)。

本實驗室在 PD 患者與正常人 cDNA 定序檢測中，發現已報導過的 R1441H 和未報導過的 R767H、S885N 突變(許玄竺, 2008)。R1441H 突變於 ROC domain 上，R767H 突變位於 ANK domain 上，S885N 突變位則於 ANK 與 LRR 兩個 domain 之間，三者對 *LRRK2* 蛋白的功能影響，尚不清楚。

貳、研究目的

LRRK2 突變與顯性遺傳帕金森氏症 PD 相關。*LRRK2* 突變中，G2019S 為白種人最常見的突變，G2385R 與 R1628P 變異則為亞洲人及華人帕金森氏症特有的危險因子。先前本實驗室在 PD 患者 cDNA 定序檢測中，發現已報導過的 R1441H 和未報導過的 R767H、S885N 突變。本研究延續 *LRRK2* 基因變異的探討，首先建構 EGFP 標記的野生型、R1441H 突變及 R1628P、G2385R 多型性變異的 *LRRK2* 質體(含 S1647T、M2397T 多型性)，送到 HEK-293T 細胞中表現。利用共軛焦顯微鏡觀察、西方轉漬分析等，來研究上述變異是否對 *LRRK2* 蛋白在細胞內的位置及合成有影響。其次選殖 α -synuclein cDNA，與 R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 *LRRK2* 質體共轉染入 SK-N-SH 細胞，藉細胞免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡觀察，來探究突變的 *LRRK2* 形成聚集(aggregation)的情形，及聚集中是否包含 α -synuclein。最後選殖 ARHGEF7 cDNA，並建構 Myc-His 標記的野生型及上述 4 種突變型的 *LRRK2* 質體(不含 S1647T、M2397T 多型性)，共轉染入 HEK-293T 細胞，來探究 R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變是否影響 *LRRK2* 蛋白與 ARHGEF7 的交互作用。

參、研究材料與方法

一、R1441H、R1628P、G2385R 對 LRRK2 蛋白在細胞內的位置及合成的影響

(一) EGFP標記的LRRK2 cDNA質體建構

圖二顯示置入pcDNA3 載體*NotI*切位的野生型LRRK2-EGFP cDNA質體(包含S1647T、M2397T多型性)(由江佩茹製備)。將上述LRRK2-EGFP質體，利用*XbaI* (辨識序列T/CTAGA)限制酶切下包含R1441H、R1628P及G2385R位置的片段(圖三)，選殖到pGEM-T質體*SpeI* (辨識序列A/CTAGT)切位中，進行定點突變(表一)，經DNA定序確認後，得到包含R1441H突變或R1628P、G2385R多型性片段的質體。最後再用*EcoNI*、*XhoI* (圖三)限制酶，切下包含R1441H突變或R1628P、G2385R多型性片段，置換野生型LRRK2-EGFP cDNA質體上相對應的片段，即完成 pLRRK2/R1441H-EGFP、pLRRK2/R1628P-EGFP、pLRRK2/G2385R-EGFP重組質體的文構。文構好的R1441H突變及R1628P、G2385R多型性質體以限制酶*ClaI*、*XhoI*切割確認結構的正確，並分別以限制酶*BstUI*、*FspBI*、*AccI*切割，確認R1441H (限制酶*BstUI*切位消失)、R1628P (新增限制酶*FspBI*切

位)、G2385R (新增限制酶AccI切位)的變異。

上述接合好的 pLRRK2-EGFP 重組質體以電穿孔(electroporation) (BIO-RAD, GENE PULSERII)方式轉形(transformation)入 *E. coli* 轉形勝任細胞內。挑選單一菌落，以鹼性溶菌法(Sambrook et al., 1989)少量抽取質體 DNA，進行限制酵素切割圖譜分析與 cDNA 定序。確認無誤後，利用 Plasmid Midi Kit (Geneaid)大量製備與保存選殖成功的野生型及 R1441H、R1628P、G2385R 突變或多型性重組質體 DNA。

(二)細胞培養

HEK-293T細胞培養於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% FBS、1.0 mM sodium pyruvate、1.5 g/l sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin的DMEM培養液(Gibco)，待細胞生長至7、8分滿，以1:5 ~ 1:10的稀釋比例進行細胞繼代培養。

(三)基因轉染(Transfection)

接種 7×10^5 HEK-293T細胞於 6 孔細胞培養盤中。第二天，進行 pEGFP-N1、pcDNA3、LRRK2-EGFP (野生型與R1441H、R1628P、G2385R 變異)的轉染。其方法為：取 4 μ l Lipofectamine 2000

(Invitrogen)，加入 250 μ l 去血清且不含抗生素之 OptiMEM 培養液 (Gibco)，混合均勻。再取 4 μ g 質體 DNA，加入 250 μ l OptiMEM 培養液，混合均勻。接著將已作用 5 分鐘的 Lipofectamine - OptiMEM 混合液加入質體 DNA - OptiMEM 混合液。20 分鐘後加入上述 500 μ l 的 Lipofectamine - 質體 DNA - OptiMEM 混合液，加到上述 6 孔細胞培養盤的細胞中培養 6 小時。之後換掉含 Lipofectamine 的培養液，改以含篩選抗生素的培養液。

(四)西方轉漬法(Western blot)

轉染二天後離心收集細胞，以 PBS 清洗兩次，收集細胞。加入適量不含清潔劑的 hypotonic lysis buffer，置於冰上作用 30 分鐘後，超音波震盪 30 下，以 $14,000 \times g$ 離心 15 ~ 20 分鐘。所得上清液經 Bio-Rad Protein Assay 定量蛋白質後，取等量(50 μ g)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 5~10 分鐘後置於冰上，進行 10% SDS-聚丙烯醯胺電泳(SDS-PAGE)，以分離蛋白質。電泳完畢後，利用 XCell II TM Blot Module (Invitrogen)及 transfer buffer (25 mM Tris - 0.2 M glycine - 20% methanol)，將蛋白轉漬至硝化纖維膜(nitrocellulose transfer membrane, Whatman)上。轉漬完成後，

浸泡膜於 blocking buffer (10% skim milk - PBS)，置 4°C 中隔夜。Blocking 完後以 wash buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0 - 0.05% Tween 20) 清洗硝化纖維膜三次，每次 15 分鐘。加入 LRRK2 (1:200 稀釋，Abgent)、GFP (1:500 稀釋，Santa cruz)、 β -actin (1:5000 稀釋，Novus Biological) 一級抗體於室溫下作用 2 小時後，以 wash buffer 清洗膜三次，每次 15 分鐘。接著加入 horseradish peroxidase (HRP) conjugated 二級抗體(1:10000 稀釋，GeneTex)，於室溫作用 1.5 小時。之後以 wash buffer 清洗膜三次，每次 15 分鐘。最後加入冷光呈色試劑(Millipore) 於膜上，以冷光儀及 ImagerReader LAS-3000 軟體偵測野生型與 R1441H、R1628P、G2385R 變異的 LRRK2-EGFP 融合蛋白表現情形。

(五)共軛焦顯微鏡觀察

接種 3×10^4 HEK-293T 細胞於已經過 poly-L-lysine (100 μ g/ml, Sigma) 處理的 coverslips (置於 12 孔細胞培養盤中)。第二天進行 pcDNA3、pEGFP-N1、pLRRK2-EGFP (野生型與 R1441H、R1628P、G2385R 變異) 的轉染(0.5 μ l Lipofectamine 2000、0.5 μ g 質體 DNA)。培養二天後染色並移除培養液，將細胞以 PBS 潤洗兩次後，使用 Leica TCS SP2 共軛焦顯微鏡觀察。

1. 觀察 LRRK2-EGFP 融合蛋白於細胞中的表現

培養二天後，加入 Hoechst33342 核染劑(1 $\mu\text{g/ml}$)到培養液，作用 20 分鐘。染色完成、潤洗後，使用共軛焦顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白表現情形。

2.觀察LRRK2-EGFP與粒線體重疊情形

粒線體的染色如下：先將 400 nM粒線體染劑(MitoTracker Red, Invitrogen) 加到培養液中，37°C 避光處理。40 分鐘後，加入 Hoechst33342 核染劑(1 $\mu\text{g/ml}$)到培養液，37°C 避光處理 20 分鐘。染色完成、潤洗後，使用螢光顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白表現情形及是否與與粒線體重疊。

3.觀察LRRK2-EGFP與溶小體重疊情形

溶小體的染色如下：先將溶小體染劑(LysoTracker Red, Invitrogen) 加到培養液中，37°C 避光處理。40 分鐘後，加入Hoechst33342 核染劑(1 $\mu\text{g/ml}$)到培養液，37°C 避光處理 20 分鐘。染色完成、潤洗後，使用螢光顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白表現情形及是否與與粒線體重疊。

4.觀察 LRRK2- EGFP 與內質網重疊情形

在進行載體及各重組質體的轉染時，共轉染pDsRed2-ER質體(0.1

µg, Clontech)。二天後再加入Hoechst33342 核染劑(1 µg/ml)到培養液作用 20 分鐘。染色完成、潤洗後，使用共軛焦顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白表現情形及是否與內質網重疊。

二、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成聚集的情形

(一) α -synuclein cDNA 選殖

以NCBI搜尋到的 α -synuclein cDNA序列(NM_000345)設計正向及反向引子(5'-GCGGCCGCCCATGGATGTATTCATGAAAGG-3'、5'-AGATCTGGCTTCAGGTTTCGTAGTCTTG-3')，並在引子末端分別引入*NotI* (GCGGCCGC)和*BgIII* (AGATCT)的限制酵素切位，作為後續質體建構的接點。使用引子進行PCR夾出 435 bp的 α -synuclein cDNA片段，先以TA選殖方式引入pGEM-T Easy質體進行定序，確認序列正確後使用*NotI*和*BgIII*的限制酵素切下片段，再與Myc-His Tag片段同時建構在pcDNA3 載體上(圖四)。

(二) EGFP標記的LRRK2 cDNA質體建構

包含R767H、S885N突變的LRRK2-EGFP質體為實驗室江佩茹學姐所建構。包含G2019S突變(GGC>AGC) (Lesage et al., 2008)的

LRRK2-EGFP質體係以定點突變的正向及反向引子(表一)來建構。經DNA定序確認後所建構的質體後，再用*Eco*NI、*Xho*I (圖五)限制酶，切下包含G2019S突變的片段，置換野生型LRRK2-EGFP cDNA質體上相對應的片段，即完成pLRRK2/G2019S-EGFP重組質體在建構。建構好的G2019S突變質體以限制酶*Cla*I、*Xho*I切割確認結構的正確，並以限制酶*Sfc*I切割，確認G2019S (新增限制酶*Sfc*I切位 CTACAG)的變異。

(三)細胞培養

SK-N-SH細胞培養於 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% FBS、1.0 mM sodium pyruvate、1.5 g/l sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin的DMEM medium (Gibco)，待細胞生長至 7、8 分滿，以 1:5 ~ 1:10 的稀釋比例進行細胞繼代培養。

(四)基因共轉染(co-transfection)

玻片過火置於 12 孔細胞培養盤裡，並使用poly-L-lysine附著在玻片上，接種SK-N-SH細胞(3×10^5)於 12 孔細胞培養盤玻片上。第二天，進行pEGFP-N1、pcDNA3、LRRK2-EGFP (野生型與R767H、S885N、R1441H、G2019S變異)與 α -synuclein-Myc-His的共轉染。其方法為：

取 2.5 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 加入 100 μ l 去血清且不含抗生素之 OptiMEM 培養液(Gibco), 混合均勻。再取 2 μ g LRRK2 質體 DNA 和 0.5 μ g α -synuclein 質體 DNA, 加入 100 μ l OptiMEM 培養液, 混合均勻。接著將已作用 5 分鐘的 Lipofectamine - OptiMEM 混合液加入 質體 DNA - OptiMEM 混合液。20 分鐘後加入上述 200 μ l 的 Lipofectamine - 質體 DNA - OptiMEM 混合液, 加到上述 12 孔細胞培養盤的細胞中培養 6 小時。之後換掉含 Lipofectamine 的培養液, 改以含篩選抗生素的培養液。

(五)細胞免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡觀察

將轉染過的細胞用 PBS 清洗兩次後, 用 paraformaldehyde/PBS (4%) 固定 15 分鐘, 再以 Triton X-100/PBS (0.1%) 作細胞穿孔 15 分鐘。PBS 清洗兩次, 之後浸泡於 blocking buffer (1% BSA - 5% FBS - PBS), 置 4 $^{\circ}$ C 中隔夜。Blocking 完後, 吸除 blocking buffer 加入 α -synuclein 一級抗體(1:100 稀釋, BD Biosciences)置 4 $^{\circ}$ C 中隔夜。再以 PBST (0.1% Tween 20 - PBS) 清洗三次, 每次 15 分鐘。接著加入 Cy5 或 TRITC conjugated 二級抗體(1:500 稀釋, Zymed Laboratories), 於室溫作用 2 小時。之後以 PBST 清洗三次, 每次 15 分鐘。封片後於共軛焦螢光顯微鏡觀察。

(六)活細胞影像儀觀察

將野生型及各突變型 LRRK2-EGFP 重組質體轉染入 HEK-293T 細胞表現。隔天加入細胞週期的抑制劑 oxaliplatin (5mM, Sigma), 以抑制細胞分裂, 使 LRRK2-EGFP 融合蛋白累積在細胞內。靜待 2、4、6 天, 最後利用活細胞影像儀觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白表現與聚集表現分佈情況等。

三、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成二元體的情形

(一) Myc-His 標記的 LRRK2 質體建構

圖二顯示置入 pcDNA3 載體的 *NotI/XhoI* 切位的野生型 LRRK2-Myc-His cDNA 質體(包含 S1647T、M2397T 多型性)(由江佩茹製備), 圖形上方並標示出 *BamHI*、*XhoI* 限制酶切位間的 Myc epitope 及 Polyhistidine tag。取上述包含 S1647T、M2397T 多型性的質體, 以定點突變法(表一)建構出不包含 S1647T、M2397T 多型性的野生型 LRRK2-Myc-His 質體, 並以 DNA 定序確認之。取此不包含 S1647T、M2397T 多型性的野生型 LRRK2-Myc-His 質體, 再以定點突變法(表一)建構出 R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變的 LRRK2-Myc-His cDNA 質體。上述建構好的 LRRK2-Myc-His 重組質體經電穿孔轉形入

*E. coli*轉形勝任細胞內。挑選單一菌落，以鹼性溶菌法小量抽取質體DNA，進行限制酵素切割圖譜分析與cDNA定序。確認無誤後，利用大量製備與保存選殖成功的野生型及R767H、S885N、R1441H、G2019S等突變型重組質體DNA。

(二)基因轉染及西方轉漬分析

接種HEK-293T細胞(7×10^5)於6孔細胞培養盤中。第二天，進行pcDNA3-LRRK2-Myc-His (野生型與R767H、S885N、R1441H、G2019S突變)的轉染，其方法如前所述(第10頁)。轉染二天後離心收集細胞，以PBS清洗後，萃取蛋白液並以LRRK2 (1:200 稀釋)、Myc (1:500 稀釋，Santa cruz)、 β -actin (1:5000 稀釋，Novus Biologicals)抗體進行西方轉漬法分析，其方法如前所述(第11-12頁)。最後加入冷光呈色試劑於膜上，以冷光儀及ImagerReader LAS-3000 軟體偵測野生型與R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2-Myc-His融合蛋白表現情形。

(三) LRRK2-Myc-His 與 LRRK2-EGFP 形成二元體的分析

接種HEK-293T細胞(7×10^5)於6孔細胞培養盤中。第二天，進行pcDNA3、LRRK2-Myc-His與LRRK2-EGFP質體 (野生型與R767H、S885N、R1441H、G2019S突變)的共轉染，Myc和EGFP標記質體以相

同LRRK2 序列(同為野生型或變異點)的組合作共轉染，並以pcDNA3 與野生型LRRK2-EGFP質體的共轉染作為沉降試驗的控制組，轉染方法如前所述(第 10 頁)。共轉染二天後離心收集細胞，以PBS清洗後，加入Native binding buffer (Ni-NTA Purification System, Invitrogen)萃取蛋白液，以 550 μ g的總蛋白液加入 20 μ l Ni-NTA agarose在 4 $^{\circ}$ C 緩慢搖晃至隔夜，離心沉澱Ni-NTA agarose後，用Native binding buffer清洗三次後，加入 20 μ l SDS sample buffer，經 100 $^{\circ}$ C、3 分鐘處理使蛋白溶解出，另外用 50 μ g原蛋白液作為輸入控制組，同時以西方轉漬法跑膠分析並以GFP (1:500 稀釋，Santa cruz)、Myc (1:500 稀釋，Santa cruz)、 β -actin (1:5000 稀釋，Novus Biologicals)抗體進行西方轉漬法分析，其方法如前所述(第 11-12 頁)。最後加入冷光呈色試劑(Millipore)於膜上，以冷光儀及ImagerReader LAS-3000 軟體偵測野生型與 R767H、S885N、R1441H、G2019S突變的LRRK2-Myc-His蛋白形成二元體的情形。

四、R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變的 LRRK2 蛋白與 ARHGEF7 蛋白結合測試

(一) ARHGEF7 cDNA 選殖

依NCBI的ARHGEF7 cDNA序列(NM_145735)，設計正向及反向

引子 (5'-ATGGATCCATGAATTCCGCCGAGCAAACCGTTAC-3'、5'-GCTTCGAAGTTCTGGTGAGAGATATATGAGCAACAGC-3')，並在引子末端分別引入*Bam*HI (GGATCC)和*Sfu*I (TTCGAA)的限制酵素切位，作為後續質體建構的接點。使用引子進行PCR夾出 2362 bp的 ARHGEF7 cDNA片段，先以TA選殖方式引入pGEM-T Easy質體進行定序，確認序列正確後使用*Bam*HI和*Sfu*I的限制酵素切下片段，建構在pcDNA3.1/V5-His/*lacZ*載體上(圖六)。

(二) LRRK2 與 ARHGEF7 蛋白的免疫共沉澱分析

接種HEK-293T細胞(7×10^5)於 6 孔細胞培養盤玻片上。第二天，進行LRRK2-Myc-His (野生型與R767H、S885N、R1441H、G2019S突變，2.5 μ g)與ARHGEF7-V5-His或pcDNA3.1/V5-His/*lacZ*載體(0.25 μ g)的共轉染，其方法為其方法如前所述(第 10 頁)。轉染二天後離心收集細胞，以PBS清洗兩次，加入適量含清潔劑的CHAPS lysis buffer (20 mM Tris-Base - 20 mM NaCl - 1 mM EDTA - 5 mM EGTA - 20 mM β -glycerol phosphate - 1 mM DTT - 0.25% CHAPS)，並加入protease inhibitor cocktail (0.0002% Aprptinin - 0.0002% Leupepin - 0.0007% Pepstain A - 0.017% PMSF) (Biovision)及phosphatase inhibitor (5 mM NaF - 1 mM Na₃VO₄ - 20 nM Calyculin)，置於冰上作用 30 分鐘後，超音波震盪 10 下，以 14,000 \times g離心 15 ~ 20 分鐘。所得上清液經Bio-Rad

Protein Assay定量蛋白質後，取等量(800 μg)蛋白質，加入 25 μl V5-agarose bead在 4 $^{\circ}\text{C}$ 緩慢搖晃至隔夜。第二天，用CHAPS lysis buffer清洗三次，將V5-agarose bead離心沉澱，加入 25 μl 的 1X SDS sample buffer，經 100 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分鐘處理使蛋白溶解出，另外用 50 μg 原蛋白液作為輸入控制組，同時以西方轉漬法跑膠分析，使用一級抗體Myc (1:500 稀釋，Santa cruz)、V5 (1:1000 稀釋，GeneTex)及horseradish peroxidase (HRP) conjugated二級抗體(1:5000 稀釋，GeneTex)。

肆、結果

一、R1441H、R1628P、G2385R 對 LRRK2 蛋白在細胞內的位置及合成的影響

(一) EGFP標記的LRRK2 cDNA

包含S1647T、M2397T多型性的LRRK2-EGFP質體(圖二)為實驗室江佩茹學姐所建構。R1441H、R1628P、G2385R的LRRK2-EGFP重組質體的建構如圖三。建構好的R1441H突變及R1628P、G2385R多型性質體以限制酶*Clal*、*XhoI*切割確認結構的正確，並分別以限制酶*BstUI*、*FspBI*、*AccI*切割，確認R1441H (限制酶*BstUI*切位消失)、R1628P (新增限制酶*FspBI*切位)、G2385R (新增限制酶*AccI*切位)的變異(圖七)。

(二)西方轉漬分析 R1441H、R1628P、G2385R 對 LRRK2 合成的影響

將野生型及R1441H、R1628P、G2385R變異的LRRK2-EGFP重組質體轉染入HEK-293T細胞表現。二天後蒐集細胞液，進行西方轉漬分析，結果顯示於圖八。LRRK2、GFP抗體可偵測到約 305 及 180 kDa 的野生型及突變型LRRK2-EGFP融合蛋白。

(三) LRRK2-EGFP 融合蛋白的共軛焦螢光顯微鏡觀察

將上述野生型及 R1441H、R1628P、G2385R 變異的 LRRK2-EGFP 重組質體轉染入 HEK-293T 細胞表現。二天後將細胞染色後使用共軛焦顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白的表現情形與表現位置等。野生型及突變型 LRRK2-EGFP 融合蛋白主要分佈在細胞質(圖九 A)，且與粒線體、溶小體及內質網(圖九 B~D)等胞器位置重疊，顯示 LRRK2-EGFP 融合蛋白會出現在上述胞器中。突變型與野生型的蛋白在細胞中表現情況相似，無明顯差異。

二、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成聚集的情形

(一) α -synuclein cDNA 選殖

結果如圖十：經限制酵素 *Bst*BI 切割後，會由 5956 bp 的片段被切割成 3903 bp、2053 bp 等 2 片段；經限制酵素 *Pvu*I 及 *Not*I 切割後，會由 5956 bp 的片段被切割成 4443 bp、1518 bp 等 2 片段；經限制酵素 *Fsp*I 切割後，會由 5956 bp 的片段被切割成 3597 bp、2324 bp 等 2 片段。

(二) EGFP標記的LRRK2/G2019S cDNA質體

LRRK2野生型、G2019S質體以限制酶*Cl*aI、*X*hoI切割確認結構的正確，G2019S質體並以限制酶*S*fcI切割(新增限制酶*S*fcI切位)，確認G2019S的變異(圖十一)。

(三) α -synuclein 免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡觀察

將野生型及突變型 LRRK2-EGFP 及 α -synuclein-Myc-His 重組質體共轉染入 SK-N-SH 細胞表現。二天後將細胞作免疫螢光染色，並以共軛焦顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白的表現情形與聚集等。結果顯示 R1441H、G2019S 突變的 LRRK2-EGFP 融合蛋白在凝集糾結(aggregation)的位置，未發現有 α -synuclein 的組成(圖十二)。

(四)活細胞影像儀觀察突變的 LRRK2 形成聚集的情形

將野生型及突變型 LRRK2-EGFP 重組質體共轉染入 HEK293T 細胞表現。在二天、四天和六天後三個時間點，以活細胞螢光顯微鏡觀察細胞形態、綠螢光融合蛋白的表現情形與聚集等。數據統計結果顯示 R1441H、G2019S 突變的 LRRK2-EGFP 融合蛋白在凝集糾結(aggregation)的數量相較野生型較多(圖十三)。

三、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成二元體的情形

(一) Myc-His 標記的 LRRK2 cDNA

以定點突變法(表一)建構出不包含S1647T、M2397T多型性的LRRK2-Myc-His質體，經DNA定序確認無誤後，再以定點突變法(表一)建構出R767H、S885N、R1441H、G2019S等突變的LRRK2-Myc-His cDNA質體，經DNA定序確認無誤後，並利用限制酵素進行圖譜分析。結果如圖十四A：經限制酵素*EcoRV*及*XhoI*切割後，會由 13210 bp 的片段被切割成 5425 bp、3262 bp、2646 bp、1877 bp等 4 片段；經限制酵素*NotI*及*BamHI*切割後，會由 13210 bp的片段被切割成 7677 bp、5475 bp、58 bp等 3 片段；經限制酵素*BamHI*及*XhoI*切割後，會由 13210 bp的片段被切割成 7735 bp、5382 bp、93 bp等 3 片段；經限制酵素*XhoI*及*NotI*切割後，會由 13210 bp的片段被切割成 7770 bp、5440 bp等 2 片段。同時進行定序，確認Myc-His tag序列的正確性(圖十四B)。

(二) Myc-His標記的LRRK2 cDNA表現

將野生型及突變型的 LRRK2-Myc-His 重組質體轉染入 HEK-293T 細胞表現。二天後蒐集細胞液，進行西方轉漬分析，結果顯示於圖十五。LRRK2、Myc 抗體則偵測到約 282 kDa 的野生型及突變型 LRRK2-Myc-His 融合蛋白。

(三) LRRK2-Myc-His、LRRK2-EGFP蛋白的二元化情形

Myc-His 標記與EGFP標記的同型LRRK2 重組質體共轉染 HEK-293T細胞，另外共轉染pcDNA3 載體及野生型(Wild type)的EGFP標記LRRK2 重組質體作為負控制組。表現二天後，收總蛋白經His標記蛋白沉降試驗，進行西方轉漬分析，結果顯示於圖十六A。在輸入控制組以GFP、Myc、actin等抗體分別偵測到約 305、282 kDa的LRRK2 重組蛋白及 43 kDa的actin蛋白；在His標記蛋白沉降試驗以GFP、Myc等抗體分別偵測到約 305 及 282 kDa的LRRK2 重組蛋白。定量統計結果顯示於圖十六B，不同變異點的LRRK2 二元體結合比例以三次His標記蛋白沉降試驗的西方轉漬分析定量，並把野生型組的二元體結合比例定標準化為 100%，可得R767H、S885N、R1441H、G2019S分別為 108%、101%、98%、114%，各變異點LRRK2的二元體結合能力相較野生型均無顯著差異($P > 0.05$)。

四、R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變的 LRRK2 蛋白的與 ARHGEF7 蛋白的結合情形

(一) ARHGEF7 cDNA 選殖

如圖十七所示，7780 bp的ARHGEF7-V5-His重組質體，經BamHI

及*Xho*I酵素雙切割後生成 6580、1200 bp兩片段，經*Bam*HI及*Sfu*I酵素雙切割後生成 5427、2353 bp兩片段，經*Afl*III酵素單切割後生成 2647、2079、2044、1010 bp四片段，顯示ARHGEF7-V5-His重組質體結構的正確。

(二) LRRK2 與 ARHGEF7 蛋白的交互作用

Myc-His標記的LRRK2 重組質體與V5-His標記的ARHGEF7 重組質體共轉染入HEK-293T細胞，細胞蛋白液經V5 抗體免疫沉澱後，進行西方轉漬分析，結果顯示於圖十八。輸入控制組以Myc、V5、actin等抗體分別偵測到約 282 kDa的LRRK2 和 90 kDa的ARHGEF7 重組蛋白及 43 kDa的actin蛋白；免疫共沉澱物以Myc、V5 等抗體分別偵測到約 282 kDa的LRRK2 和 90 kDa的ARHGEF7 重組蛋白。三次免疫共沉澱結果的定量統計結果顯示於圖十八右下，以野生型LRRK2 與ARHGEF7 的蛋白質間結合能力標準化為 100%，可得R767H、S885N、R1441H、G2019S分別為 67%、33%、20%、55%，與野生型相較，S885N、R1441H、G2019S變異點LRRK2與ARHGEF7 的蛋白質間結合能力顯著降低($P = 0.004\sim 0.000$)。R767H與ARHGEF7 蛋白的交互作用雖較弱，但差異未達顯著($P = 0.148$)。

伍、討論

一、R1441H、R1628P、G2385R 對 LRRK2 蛋白在細胞內的位置及合成的影響

外生性 LRRK2 蛋白廣泛表現在細胞質，也會表現於粒線體(West et al., 2005)，甚至在內質網和高基氏體都有發現和 LRRK2 的部份共位現象(Partial co-localization) (Gloeckner et al., 2006)。本研究中針對 LRRK2 的 R1441H 突變點及 R1628P 和 G2385R 兩個危險因子進行探討，不論在野生型 LRRK2 或是帶有 R1441H、R1628P 和 G2385R 的 LRRK2 的部份，EGFP 綠螢光與 DAPI 核染劑的藍螢光皆沒有重疊(圖九 A)，顯示 R1441H、R1628P 和 G2385R 這些變異點的 LRRK2 蛋白，主要仍分佈在細胞質。進一步胞器染色的顯微影像觀察，帶有 R1628P 與野生型的 LRRK2 與粒線體及溶小體有較多的重疊，而帶 R1441H 和 G2385R 的 LRRK2 與粒線體、溶小體重疊較少(圖九 B、C)。內質網是蛋白質轉譯後修飾的場面，在內質網染色的顯微影像中，帶有 R1441H、R1628P 和 G2385R 的 LRRK2 都有與內質網重疊(圖九 D)，顯示 R1441H、R1628P 和 G2385R 這些變異點不會影響 LRRK2 蛋白進入內質網作修飾。

二、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成聚集的情形

數個研究指出，從 PD 病人的腦組織切片的路易氏體有免疫染色觀察到有 LRRK2 蛋白的存在(Greggio et al., 2006; Giasson et al., 2006; Zhu et al., 2006; Perry et al., 2008; Alegre-Abarrategui et al., 2008)，而路易氏體主要為 α -synuclein 所構成，進一步推測 LRRK2 對 α -synuclein 之間有交互作用，所以有研究團隊以免疫共沉澱的技術證實路易氏體中的 LRRK2 和 α -synuclein 有蛋白質間交互作用，並在共轉染 LRRK2 和 α -synuclein 且受氧化壓力下的 HEK293 細胞，得到與前者組織中路易氏體相同的結果(Qing et al., 2009)。然而有研究發現，在共轉染 LRRK2 和 α -synuclein 的細胞中，在大量表現 LRRK2 蛋白下出現的 LRRK2 蛋白包含體卻沒有發現 α -synuclein 的存在(Waxman et al., 2009)。本研究選殖 α -synuclein 的 cDNA 構築成標記 Myc-His 的 α -synuclein 載體，並使用 SK-N-SH 細胞共轉染標記 EGFP 的 LRRK2 與標記 Myc-His 的 α -synuclein 質體，兩天表現後進行細胞免疫螢光染色，結果顯示帶有 R1441H 與 G2019S 的 LRRK2 似乎較容易形成聚集，然而這些聚集確沒有發現 α -synuclein 的存在(圖十二)，這個結果與 Waxman et al. (2009)是相似的，推測 LRRK2 與 α -synuclein 間的

交互作用可能有其他成員的參與，有待日後進一步的研究驗證。

針對帶有 R1441H 與 G2019S 的 LRRK2 似乎較容易形成 LRRK2 蛋白聚集，本研究使用 HEK293T 細胞轉染標記 EGFP 的 LRRK2 質體，以活細胞螢光顯微鏡在轉染 2 天、4 天及 6 天後進行細胞觀察和影像拍攝，計算細胞 LRRK2 蛋白聚集與細胞數量後，進行統計分析，結果顯示於圖十三。與野生型的 LRRK2 相比較，帶有 R1441H 與 G2019S 的 LRRK2 顯著地會形成較多 LRRK2 蛋白聚集。這些 LRRK2 蛋白聚集雖然沒有 α -synuclein 的存在，但這種因蛋白質氨基酸改變導致容易形成聚集，可能和 PD 的致病機轉有一定程度上的關聯，其關聯還有待進一步的研究驗證與探討。

三、R767H、S885N、R1441H、G2019S 突變的 LRRK2 形成二元體的情形

LRRK2 蛋白在細胞中會部份形成二元體，不論在活體中或活體外皆被證實(Deng et al., 2008; Greggio et al., 2008; Sen et al., 2009)，二元體的形成代表 LRRK2 蛋白在細胞中與其單體可能有不同的生理功能，因此研究 LRRK2 蛋白二元體的形成機轉有助於釐清 LRRK2 蛋白在細胞中扮演的角色。在過去研究指出，LRRK2 蛋白的第 935 個

胺基酸(S935)是一個重要的磷酸位點，免疫共沉澱試驗證實該磷酸位點突變後不會影響 LRRK2 蛋白二元體的形成(Li et al., 2011)。因此本研究以 His 標記蛋白沉降試驗，試圖探討在 R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變的 LRRK2 蛋白在二元體形成能力上是否有所差異。從圖十六 B 定量統計結果顯示，上述變異點 LRRK2 的二元體結合能力相較野生型均無顯著差異，故推測 R767H、S885N、R1441H、G2019S 等變異的 LRRK2 蛋白的致病機轉與 LRRK2 蛋白二元體形成能力無關，因此日後研究可以著重在 LRRK2 蛋白二元體和單體在生理功能上所扮演的角色。

四、R767H、S885N、R1441H、G2019S 等突變的 LRRK2 蛋白與 ARHGEF7 蛋白的交互作用

LRRK2 蛋白包含多個功能區，目前研究 LRRK2 蛋白功能主要是針對其兩個具有酵素活性的功能區－ROC 和 MAPKKK 功能區。MAPKKK 功能區具有激酶活性能夠使其受質磷酸化或是自我磷酸化，而 LRRK2 蛋白明確的受質尚不清楚；ROC 功能區具有 GTP 水解酶活性能夠使 GTP 水解成 GDP。雖然 LRRK2 變異導致 PD 的致病機轉尚不清楚，但推測與其激酶活性或 GTP 水解酶活性的變異相關聯，所以多數研究聚焦在探討變異點對這兩個酵素活性的影響，期望

借此瞭解 LRRK2 蛋白變異的致病機轉。本研究亦擬探討 R767H、S885N、R1441H 變異是否影響 LRRK2 蛋白的 GTP 水解酶活性。由於 ARHGEF7 蛋白會幫助 LRRK2 蛋白上結合的 GDP 轉換成 GTP (Haebig et al., 2010)，因此建構 ARHGEF7-V5-His 質體，期望藉分析 ARHGEF7 與變異的 LRRK2 蛋白之間的交互作用，來探究上述變異點對 LRRK2 GTP 水解酶活性的影響。結果發現 S885N、R1441H 或 G2019S 的 LRRK2 與 ARHGEF7 蛋白的交互作用顯著減弱(圖十八)。先前 Haebig 團隊研究 R1441C 變異，發現 R1441C 變異導致 LRRK2 與 ARHGEF7 結合減弱，此結果與本研究的 R1441H 相似。由於與 ARHGEF7 結合的減弱會進一步導致 LRRK2 的 GTP 結合及水解酶活性降低(Haebig et al., 2010)，且帶有 R1441C 的全長 LRRK2 蛋白水解 GTP 的活性較野生型弱(Xiong et al., 2010)，故推測 R1441H 突變導致的 LRRK2 GTP 結合及水解酶活性降低，與 PD 致病機轉相關。值得一提的是，本研究探究的新穎突變 S885N LRRK2 與 ARHGEF7 交互作用亦顯著低於野生型 LRRK2，故推測 S885N 雖不在 ROC 功能區上，可能還是會影響 LRRK2 水解 GTP 的活性，此有待日後進一步的 LRRK2-GTP 結合及水解酶活性測試研究來證實。另外，本研究的 G2019S 的結果與 Haebig 團隊的報導相異，亦有待進一步探討。

陸、參考文獻

許玄竺(2008)。 *LRRK2*、*GRN* 基因變異與台灣帕金森氏症、額顳葉型失智症的相關性研究。國立台灣師範大學生命科學系九十七學年度碩士論文。

Alegre-Abarrategui J, Ansorge O, Esiri M, Wade-Martins R. (2008) *LRRK2* is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34: 272-283.

An XK, Peng R, Li T, Burgunder JM, Wu Y, Chen WJ, Zhang JH, Wang YC, Xu YM, Gou YR, Yuan GG, Zhang ZJ. (2008) *LRRK2* Gly2385Arg variant is a risk factor of Parkinson's disease among Han-Chinese from mainland China. *Eur J Neurol* 15: 301-305.

Belin AC, Westerlund M. (2008) Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J* 275: 1377-1383.

Berg D, Schweitzer K, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, Brussel T, Schulte C, Maass S, Nagele T. (2005) Type and frequency of mutations in the *LRRK2* gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain* 128: 3000-3011.

Bertram CP, Lemay M, Stelmach GE. (2005) The effect of Parkinson's disease on the control of multi-segmental coordination. *Brain Cogn* 57: 16-20.

Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G. (2003) DJ-1 (PARK7), a

novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24: 159-160.

Chen RC, Chang SF, Su CL, Chen TH, Yen MF, Wu HM, Chen ZY, Liou HH. (2001) Prevalence, incidence, and mortality of PD: a door-to-door survey in Ilan county, Taiwan. *Neurology* 57: 1679-1686.

Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW, Chung SJ, Kim JS, Shin HW, Lyoo CH, Lee PH, Baik JS, Kim SJ, Park MY, Sohn YH, Kim JH, Kim JW, Lee MS, Lee MC, Kim DH, Kim YJ. (2008) Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 9: 263-269.

Conley SC, Kirchner JT. (1999) Parkinson's disease--the shaking palsy. Underlying factors, diagnostic considerations, and clinical course. *Postgrad Med* 106: 39-42, 45-36, 49-50 passim.

Dauer W, Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.

Deng J, Lewis PA, Greggio E, Sluch E, Beilina A, Cookson MR. (2008) Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1499-1504.

Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J, Rohé CF, Riboldazzi G, Antonini A, Albani G, Mauro A, Marconi R, Abbruzzese G, Lopiano L, Fincati E, Guidi M, Marini P, Stocchi F, Onofrj M, Toni V, Tinazzi M, Fabbrini G, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Leitner P, Uitti RJ, Wszolek ZK, Gasser T, Simons EJ, Breedveld GJ, Goldwurm S, Pezzoli G, Sampaio C, Barbosa E, Martignoni E, Oostra BA, Bonifati V; Italian Parkinson's Genetics Network. (2006) Comprehensive analysis of

the *LRRK2* gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet* 14: 322-331.

Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini G, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, Squitieri F, Horstink MW, Montagna P, Libera AD, Stocchi F, Goldwurm S, Ferreira JJ, Meco G, Martignoni E, Lopiano L, Jardim LB, Oostra BA, Barbosa ER; Italian Parkinson Genetics Network, Bonifati V. (2007) *ATP13A2* missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 68: 1557-1562.

Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V. (2009) *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72: 240-245.

Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, Dartigues JF, Alperovitch A, Tzourio C, Rocca WA. (1999) Familial aggregation of Parkinson's disease: a population-based case-control study in Europe. EURO-PARKINSON Study Group. *Neurology* 52: 1876-1882.

Farrer MJ. (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7: 306-318.

Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. (2002) A new locus for Parkinson's disease (*PARK8*) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51: 296-301.

Funayama M, Li Y, Tomiyama H, Yoshino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. (2007) Leucine-rich repeat

kinase 2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. *Neuroreport* 18: 273-275.

Giasson BI, Covy JP, Bonini NM, Hurtig HI, Farrer MJ, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM. (2006) Biochemical and pathological characterization of Lrrk2. *Ann Neurol* 59: 315-322.

Giasson BI, Van Deerlin VM. (2008) Mutations in *LRRK2* as a cause of Parkinson's disease. *Neurosignals* 16: 99-105.

Gibb WR, Lees AJ. (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54: 388-396.

Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, Kolch W, Prokisch H, Ueffing M. (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet* 15: 223-232.

Greggio E, Jain S, Kingsbury A, Bandopadhyay R, Lewis P, Kaganovich A, van der Brug MP, Beilina A, Blackinton J, Thomas KJ, Ahmad R, Miller DW, Kesavapany S, Singleton A, Lees A, Harvey RJ, Harvey K, Cookson MR. (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis* 23: 329-341.

Haebig K, Gloeckner CJ, Miralles MG, Gillardon F, Schulte C, Riess O, Ueffing M, Biskup S, Bonin M. (2010) ARHGEF7 (Beta-PIX) acts as guanine nucleotide exchange factor for leucine-rich repeat kinase 2. *PLoS One* 5: e13762.

Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C. (2009) The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev* 19: 254-265.

- Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR. (2004) PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63: 1482-1485.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608.
- Langston JW. (1987) MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol* 26 Suppl 1: 2-10.
- Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR Jr, Mark MH, Golbe LI, Sage JI, Johnson WG, Duvoisin RC. (1994) A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 44: 499-506.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395: 451-452.
- Lesage S, Belarbi S, Troiano A, Condroyer C, Hecham N, Pollak P, Lohman E, Benhassine T, Ysmail-Dahlouk F, Dürr A, Tazir M, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. (2008) Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? *Neurology* 71: 1550-1552.
- Lev N, Melamed E. (2001) Heredity in Parkinson's disease: new findings. *Isr Med Assoc J* 3: 435-438.
- Li C, Ting Z, Qin X, Ying W, Li B, Guo Qiang L, Jian Fang M, Jing Z,

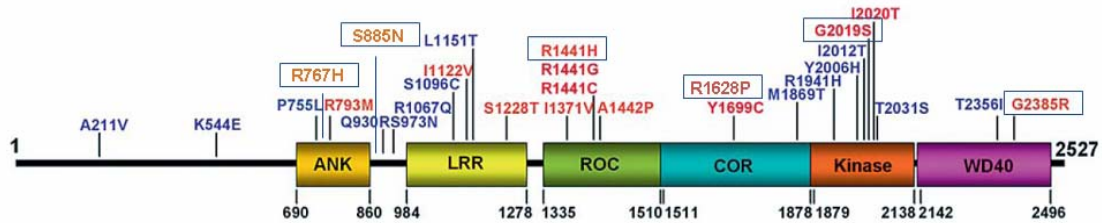
- Jian Qing D, Sheng Di C. (2007) The prevalence of *LRRK2* Gly2385Arg variant in Chinese Han population with Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: 2439-2443.
- Li X, Wang QJ, Pan N, Lee S, Zhao Y, Chait BT, Yue Z. (2011) Phosphorylation-dependent 14-3-3 binding to LRRK2 is impaired by common mutations of familial Parkinson's disease. *PLoS One* 6: e17153.
- Lin CH, Tzen KY, Yu CY, Tai CH, Farrer MJ, Wu RM. (2008) LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease in a Taiwanese population: clinical, PET, and functional studies. *J Biomed Sci* 15: 661-667.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48: 1583-1588.
- Marjama-Lyons JM, Koller WC. (2001) Parkinson's disease. Update in diagnosis and symptom management. *Geriatrics* 56: 24-25, 29-30, 33-35.
- Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Hulihan MM, Cobb SA, Wu RM, Lu CS, Lahoz C, Wszolek ZK, Farrer MJ. (2005) *Lrrk2* pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 6: 171-177.
- Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. (2006) LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 29: 286-293.
- Montgomery EB Jr. (1995) Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. *Toxicology* 97: 3-9.
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M,

- Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44: 595-600.
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A, Schneider SA. (2009) Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 65: 19-23.
- Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. (1994) Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol* 36: 659-661.
- Perry G, Zhu X, Babar AK, Siedlak SL, Yang Q, Ito G, Iwatsubo T, Smith MA, Chen SG. (2008) Leucine-rich repeat kinase 2 colocalizes with alpha-synuclein in Parkinson's disease, but not tau-containing deposits in tauopathies. *Neurodegener Dis* 5: 222-224.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.
- Qing H, Zhang Y, Deng Y, McGeer EG, McGeer PL. (2009) Lrrk2 interaction with alpha-synuclein in diffuse Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 1229-1234.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Schapira AH. (2006) Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 66: S10-23.

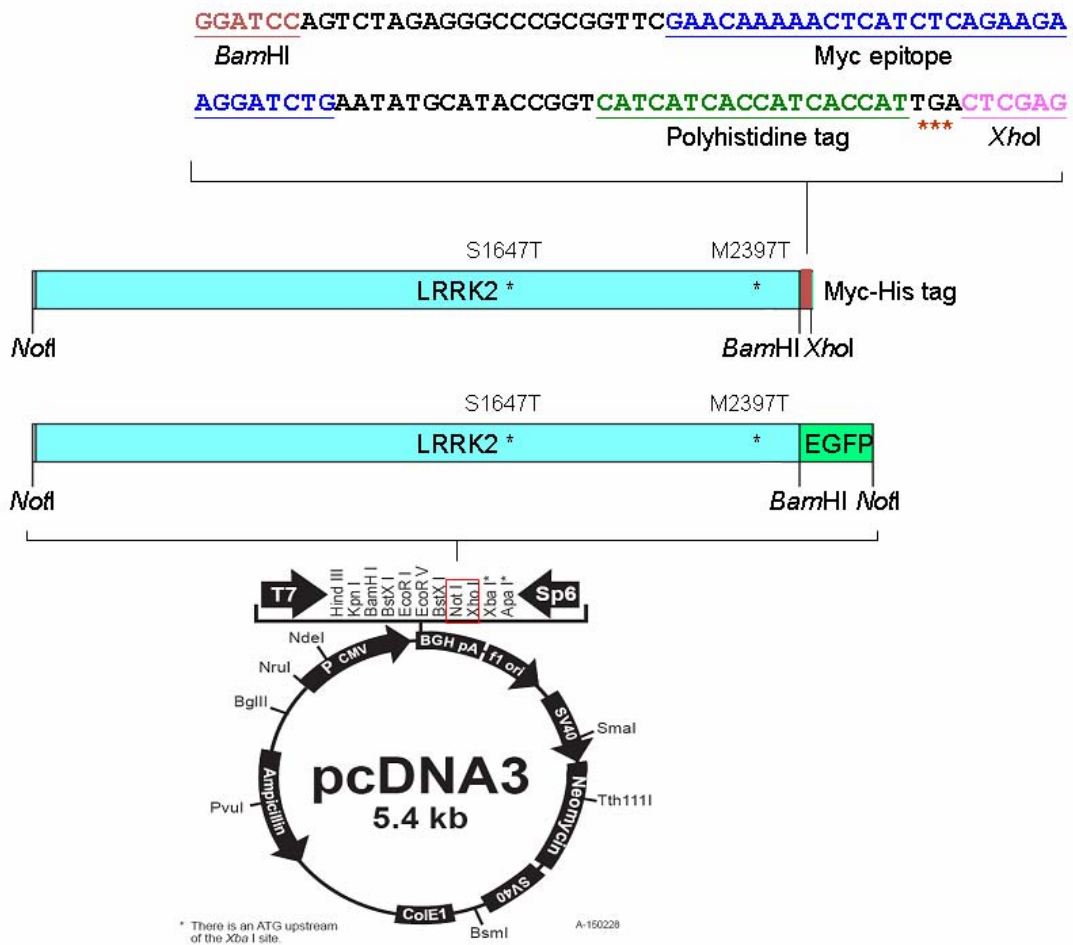
- Sen S, Webber PJ, West AB. (2009) Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. *J Biol Chem* 284: 36346-36356.
- Snyder SH, D'Amato RJ. (1986) MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology* 36: 250-258.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R. (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 2099-2111.
- Tan EK, Shen H, Tan LC, Farrer M, Yew K, Chua E, Jamora RD, Puvan K, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Yih Y, Skipper L, Liu JJ. (2005) The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 384: 327-329.
- Tan EK, Zhao Y, Skipper L, Tan MG, Di Fonzo A, Sun L, Fook-Chong S, Tang S, Chua E, Yuen Y, Tan L, Pavanni R, Wong MC, Kolatkar P, Lu CS, Bonifati V, Liu JJ. (2007) The *LRRK2* Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. *Hum Genet* 120: 857-863.
- Tan EK, Tang M, Tan LC, Wu YR, Wu RM, Ross OA, Zhao Y. (2008) *Lrrk2* R1628P in non-Chinese Asian races. *Ann Neurol* 64: 472-473.
- Taylor JP, Mata IF, Farrer MJ. (2006) *LRRK2*: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? *Trends Mol Med* 12: 76-82.

- Waxman EA, Covy JP, Bukh I, Li X, Dawson TM, Giasson BI. (2009) Leucine-rich repeat kinase 2 expression leads to aggresome formation that is not associated with alpha-synuclein inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 785-796.
- West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16842-16847.
- Wu T, Zeng Y, Ding X, Li X, Li W, Dong H, Chen S, Zhang X, Ma G, Yao J, Deng X. (2006) A novel P755L mutation in *LRRK2* gene associated with Parkinson's disease. *Neuroreport* 17: 1859-1862.
- Xiong Y, Coombes CE, Kilaru A, Li X, Gitler AD, Bowers WJ, Dawson VL, Dawson TM, Moore DJ. (2010) GTPase activity plays a key role in the pathobiology of *LRRK2*. *PLoS Genet* 6: e1000902.
- Zhu X, Babar A, Siedlak SL, Yang Q, Ito G, Iwatsubo T, Smith MA, Perry G, Chen SG. (2006) *LRRK2* in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener* 1: 17.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB. (2004) Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44: 601-607.

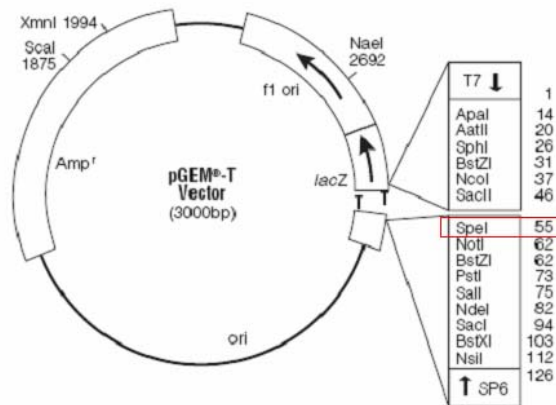
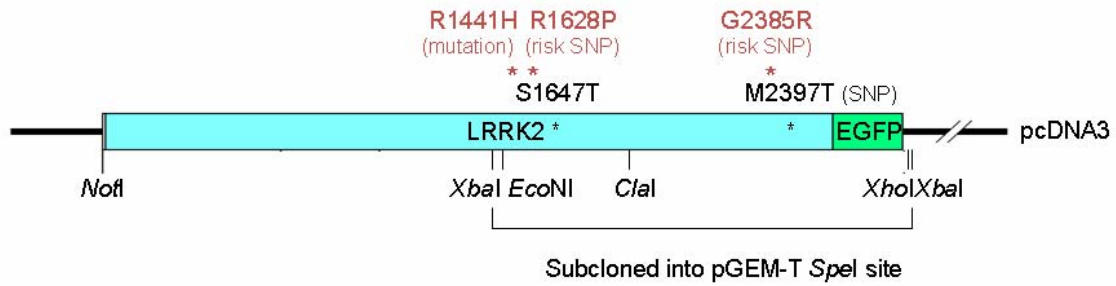
柒、附錄圖表



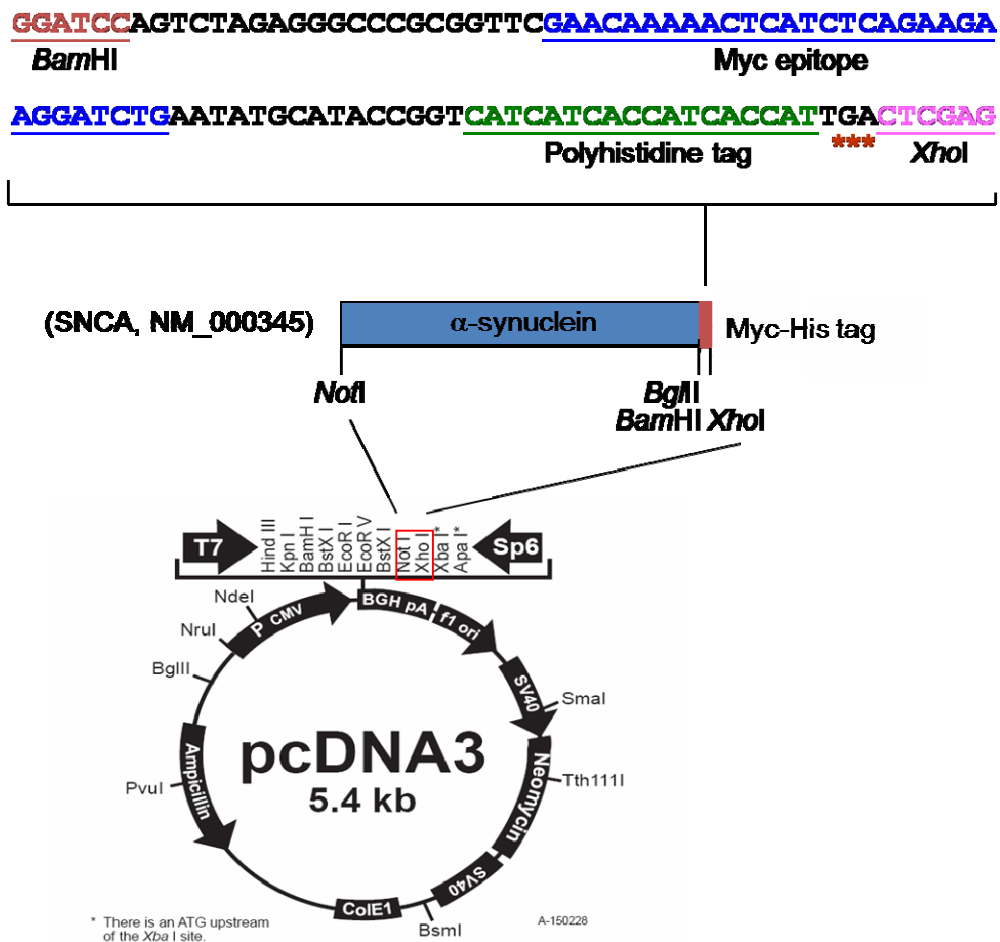
圖一、LRRK2 蛋白結構及基因突變。LRRK2 蛋白具有 6 個重要的功能區塊(domains)，包括ANK (Ankyrin repeat)、LRR (Leucine-rich repeat)、ROC (Ras of complex protein)、COR (C terminal of ROC)、MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase)以及WD40 等。基因上方紅色標記者(I1122V、R1441G、R1441C、Y1699C、G2019S、I2020T)為已確定會造成疾病的突變，橘色標記者(R793M、I1371V、R1441H、A1442P、G2385R)為無法完全確定但是可能造成疾病的突變，其餘藍色標記者為發現於PD病人的變異，但是否會造成疾病仍沒有證據。圖上並標示出本論文所研究的R767H、S885N、R1441H、R1628P、G2019S、G2385R等變異。(圖形修改自Giasson and Van Deerlin, 2008)



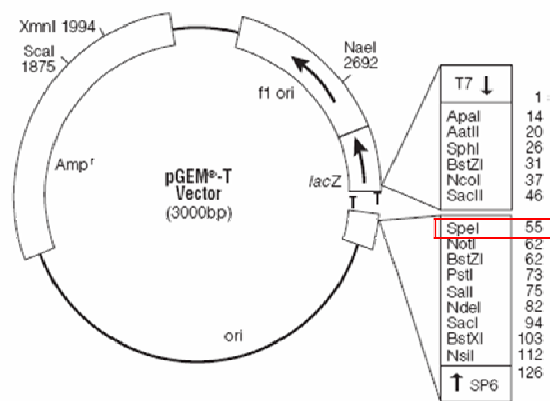
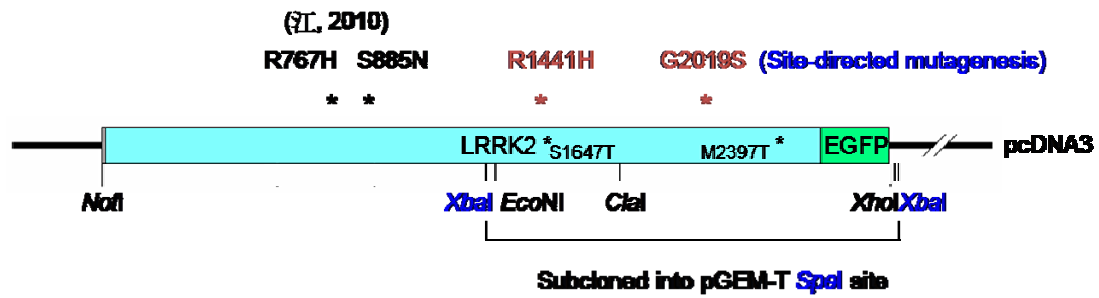
圖二、EGFP 及 Myc-His 標記的 LRRK2 cDNA 質體(包含 S1647T、M2397T 多型性)。LRRK2-EGFP、LRRK2-Myc-His 分別置入 pcDNA3 載體的 *Not*I、*Not*I/*Xho*I 限制酶切位，圖形上方並標示出 *Bam*HI、*Xho*I 限制酶切位間的 Myc epitope 及 Polyhistidine tag。



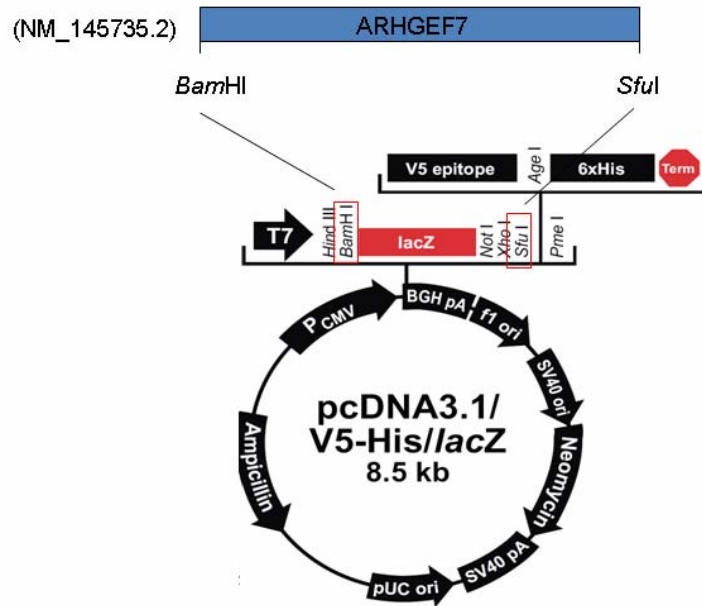
圖三、R1441H、R1628P、G2385R 變異的 LRRK2-EGFP 重組質體的構築。將帶有 EGFP 的野生型 LRRK2 質體(包含 S1647T、M2397T 多型性)，利用 *XbaI* 限制酶切下包含 R1441H、R1628P、G2385R 變異的片段，選殖到 pGEM-T 質體 *SpeI* 限制酶切位間，進行定點突變，得到 R1441H、R1628P、G2385R 變異片段的質體。再將突變好的片段以 *EcoNI*、*XhoI* 限制酶切下，置換野生型 LRRK2-EGFP 質體上相對應的片段，即完成 pLRRK2/R1441H-EGFP、pLRRK2/R1628P-EGFP、pLRRK2/G2385R-EGFP 重組質體的建構。



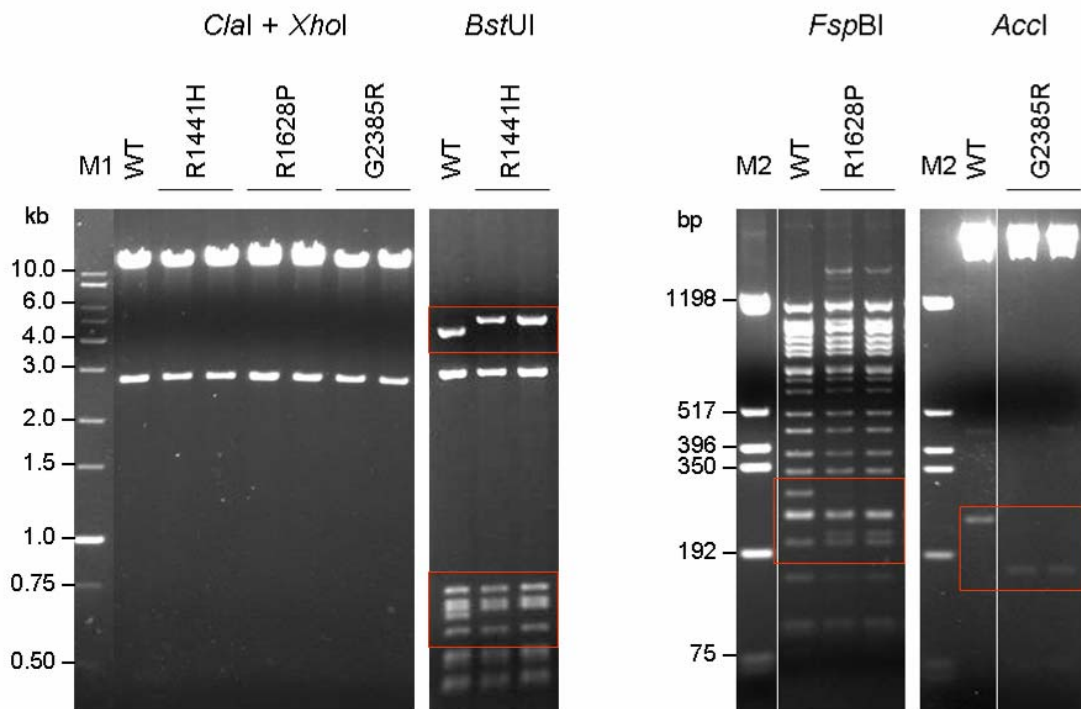
圖四、Myc-His 標記的 α -synuclein cDNA 質體。 α -synuclein-Myc-His 置入 pcDNA3 載體的 *Not*I、*Xho*I 限制酶切位，圖形上方並標示出 *Bam*HI、*Xho*I 限制酶切位間的 Myc epitope 及 Polyhistidine tag。



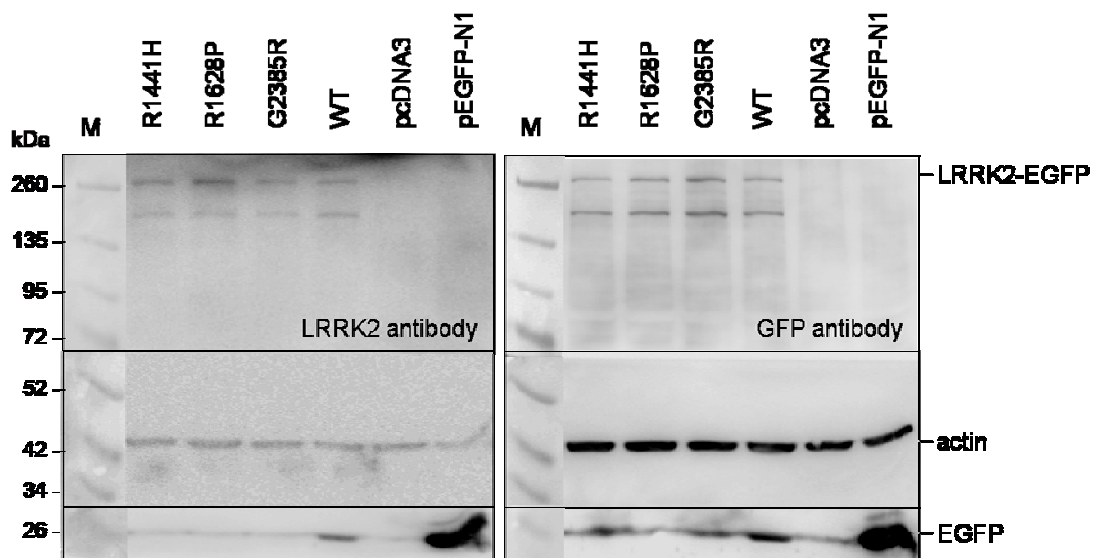
圖五、G2019S 變異的 LRRK2-EGFP 重組質體的構築。將帶有 EGFP 的野生型 LRRK2 質體(包含 S1647T、M2397T 多型性)，利用 *Xba*I 限制酶切下包含 R1441H、R1628P、G2385R 變異的片段，選殖到 pGEM-T 質體 *Spe*I 限制酶切位間，進行定點突變，得到 G2019S 變異片段的質體。再將突變好的片段以 *Eco*NI、*Xho*I 限制酶切下，置換野生型 LRRK2-EGFP 質體上相對應的片段，即完成 pLRRK2/G2019S-EGFP 重組質體的建構。



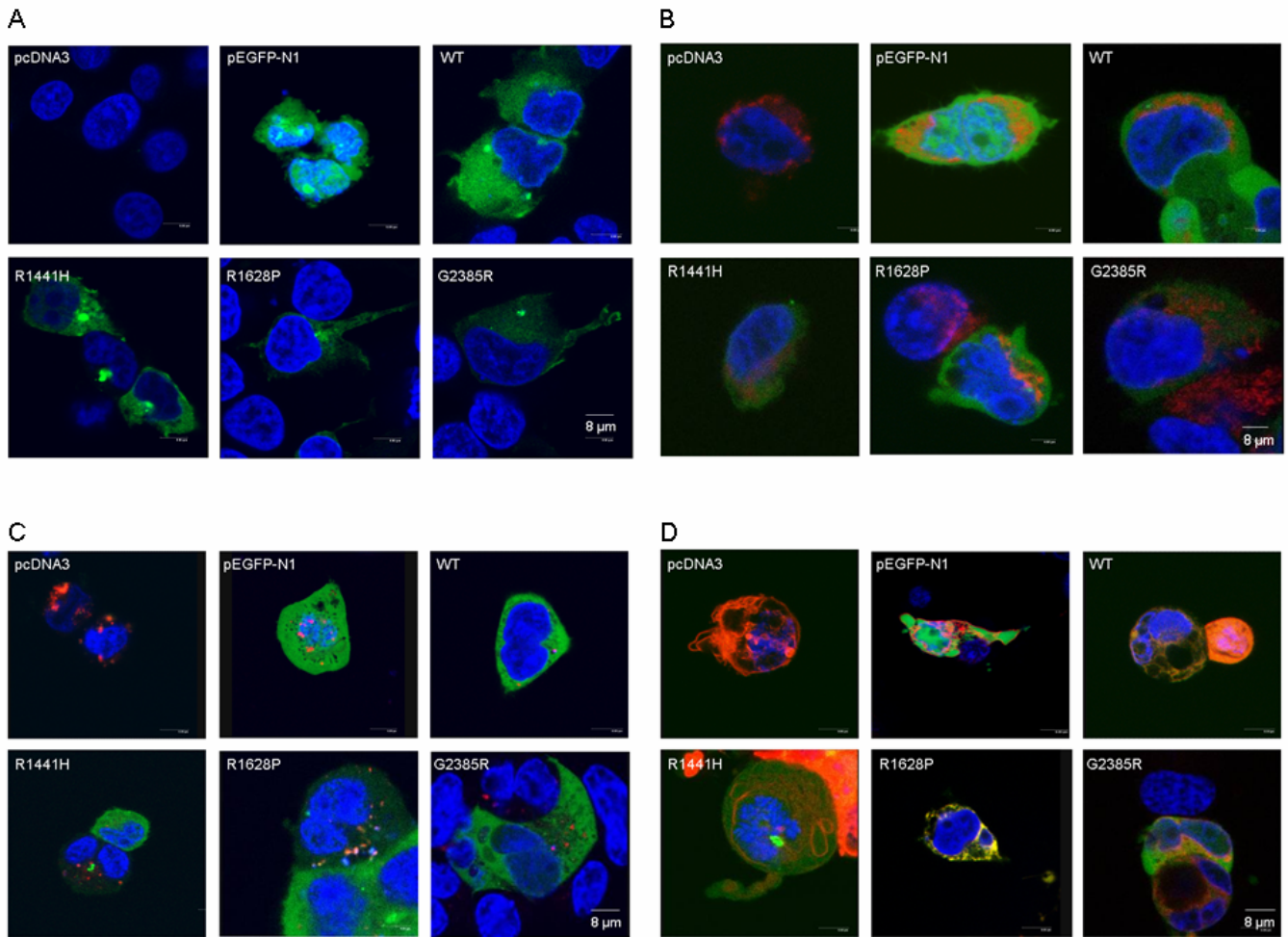
圖六、V5-His 標記的 ARHGEF7 cDNA 質體。ARHGEF7 cDNA 置入 pcDNA3.1/V5-His 載體的 *Bam*HI、*Sfu*I 限制酶切位，pcDNA3.1/V5-His 載體上並標示出 V5 epitope 及 6×His tag。



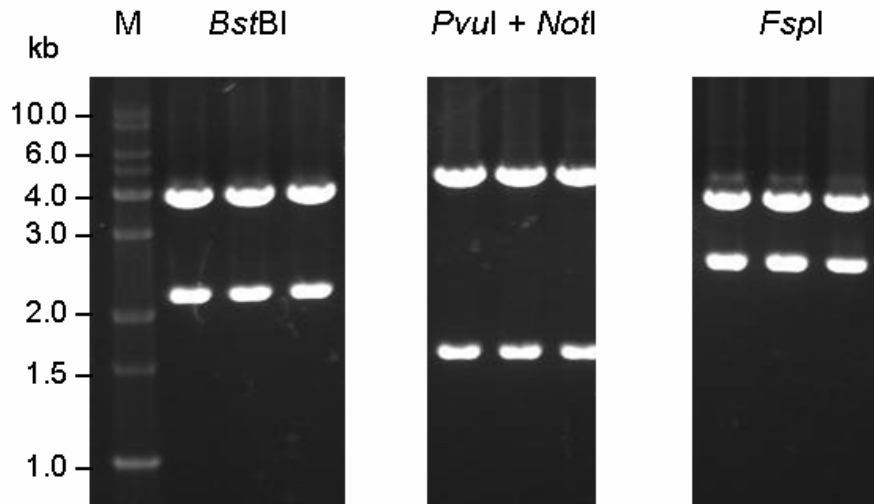
圖七、R1441H、R1628P、G2385R 變異的 LRRK2-EGFP 重組質體的
限制酶圖譜分析。野生型(WT)及突變(R1441H)或多型性變異
(R1628P、G2385R)重組質體經限制酶 *Clal* + *XhoI* 切割後的 0.8% 洋菜
膠體電泳照片，以確認結構的正確，並分別以限制酶 *BstUI*、*FspBI*、
AccI 切割，確認 R1441H (限制酶 *BstUI* 切位消失)、R1628P (新增限
制酶 *FspBI* 切位)、G2385R (新增限制酶 *AccI* 切位)的變異。Lanes M1、
M2 分別為 1 kb ladder 及 pGEM-4 質體的 *Hinfi* 限制酶切割結果，作
為片段大小標記。



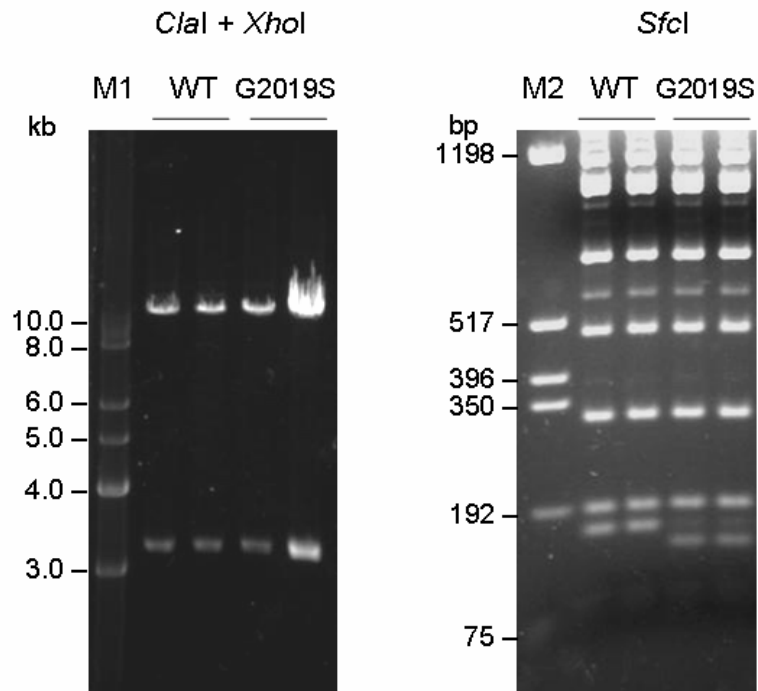
圖八、LRRK2-EGFP 融合蛋白的西方轉漬分析。突變(R1441H)、多型性變異(R1628P、G2385R)、野生型(WT)重組質體及 pcDNA3 載體、pEGFP-N1 質體，經 lipofactamine 送入 HEK-293T 細胞中表現二天後，以 LRRK2、GFP、actin 等抗體進行西方轉漬分析的結果。



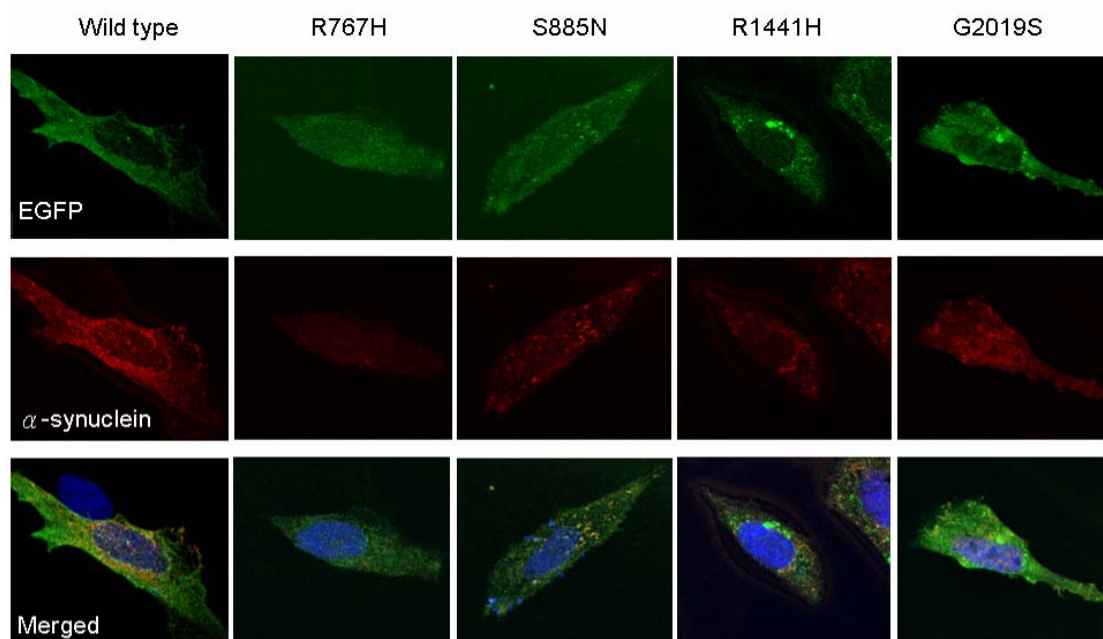
圖九、共軛焦顯微鏡觀察 LRRK2-EGFP 融合基因在 HEK-293T 細胞內表現(A)，及其與粒線體(B)、溶小體(C)、內質網(D)重疊情形。pcDNA3 載體、pEGFP-N1 質體及野生型、變異型(R1441H、R1628P、G2385R)的 LRRK2-EGFP 重組質體，經轉染(A、B、C)或與 pDsRed-ER 共轉染(D)入 HEK-293T 細胞中表現 2 天後，直接(A、D)或以 MitoTracker Red (B)、Lysotracker Red (C)染色後，進行共軛焦顯微鏡觀察綠螢光融合蛋白表現，及與粒線體、溶小體、內質網重疊情形。



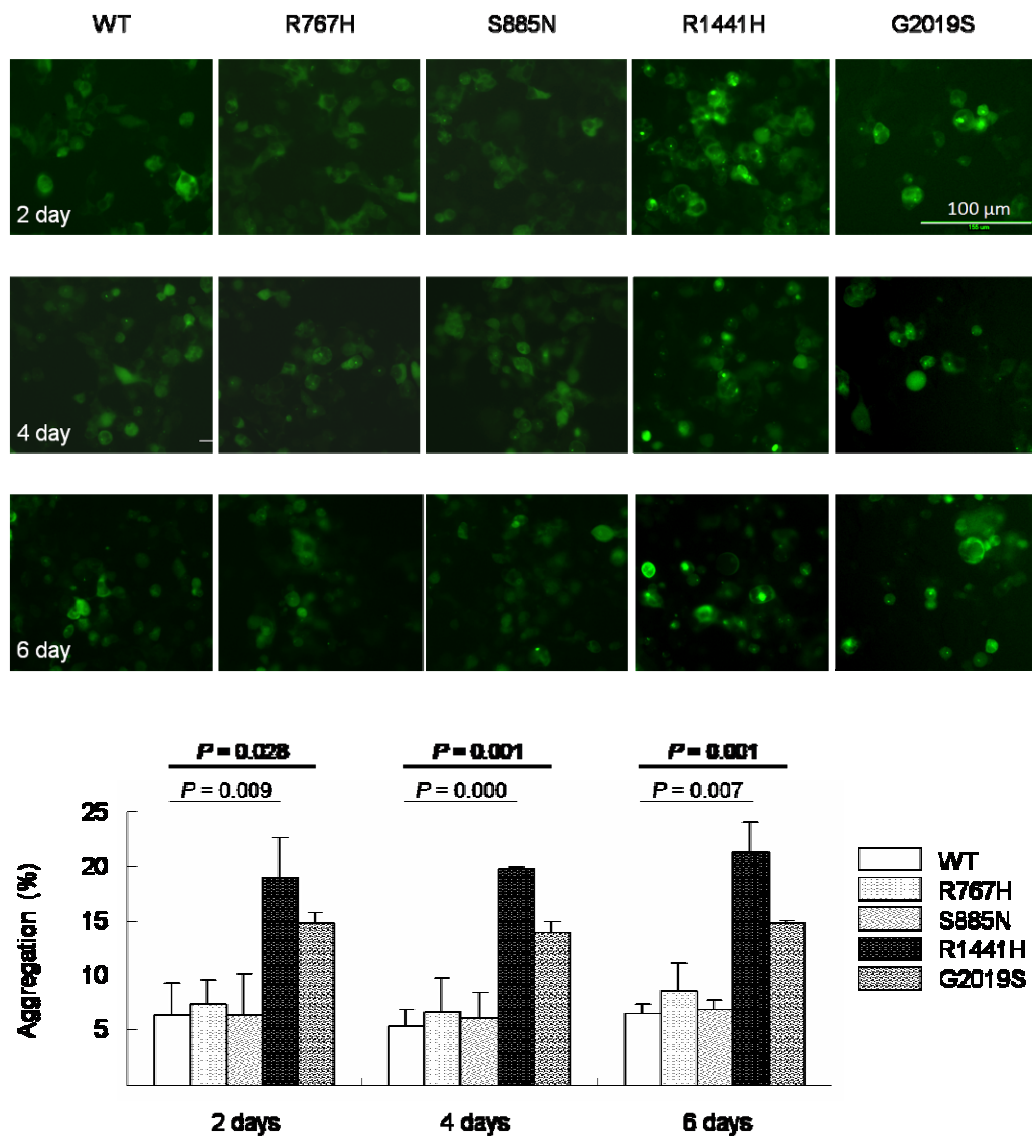
圖十、 α -synuclein-Myc-His 重組質體的限制酶圖譜分析。
 α -synuclein-Myc-His 重組質體經限制酶 *Bst*BI 和 *Fsp*I 單切割與 *Pvu*I、*Not*I 雙切割後的 0.8% 洋菜膠體電泳照片，以確認結構的正確，。Lanes M 為 1 kb ladder，作為片段大小標記。



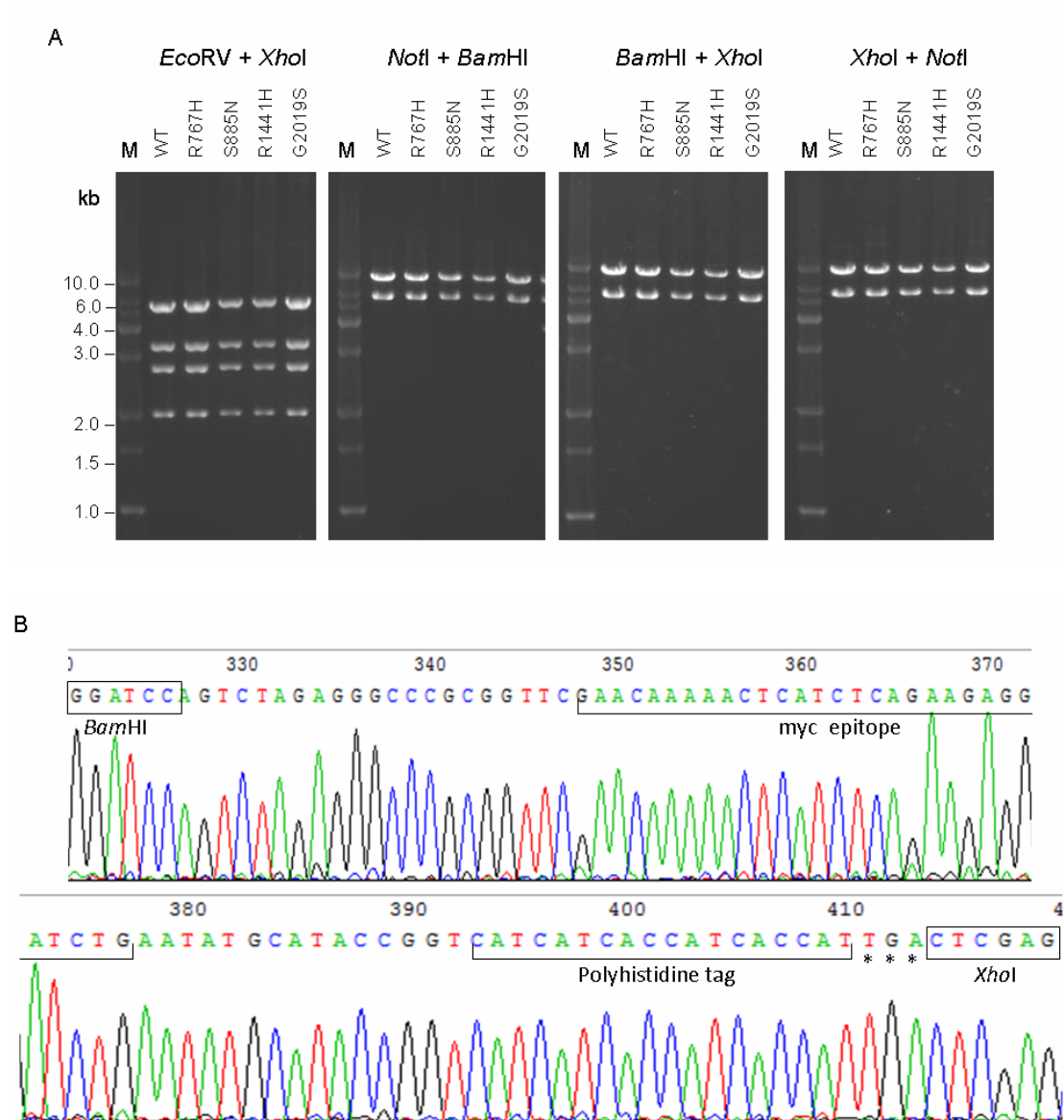
圖十一、G2019S 突變的 LRRK2-EGFP 重組質體的限制酶圖譜分析。野生型(WT)及 G2019S 突變重組質體經限制酶 *ClaI*、*XhoI* 雙切割後的 0.8% 洋菜膠體電泳照片，以確認結構的正確，並以限制酶 *SfcI* 切割，確認 G2019S (新增限制酶切位) 的變異。Lanes M1、M2 分別為 1 kb ladder 及 pGEM-4 質體的 *HinfI* 限制酶切割結果，作為片段大小標記。



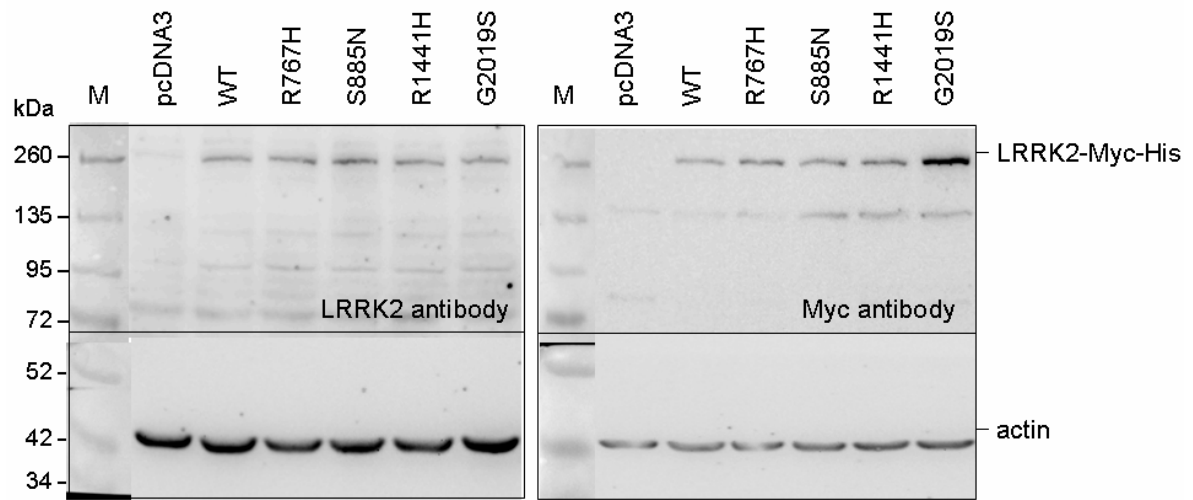
圖十二、共軛焦顯微鏡觀察 LRRK2-EGFP 融合基因在 SK-N-SH 細胞內與 α -synuclein 免疫螢光染色重疊情形。pcDNA3 載體及野生型 (WT)、突變型(R767H、S885N、R1441H、G2019S)的 LRRK2-EGFP 重組質體，經 lipofactamine 送入 SK-N-SH 細胞中表現二天後，先對 α -synuclein 作免疫螢光染色處理，再用共軛焦顯微鏡觀察 α -synuclein 和 LRRK2 融合蛋白的表現情形與位置。紅色部位為 α -synuclein，綠色為 LRRK2-EGFP 融合蛋白。



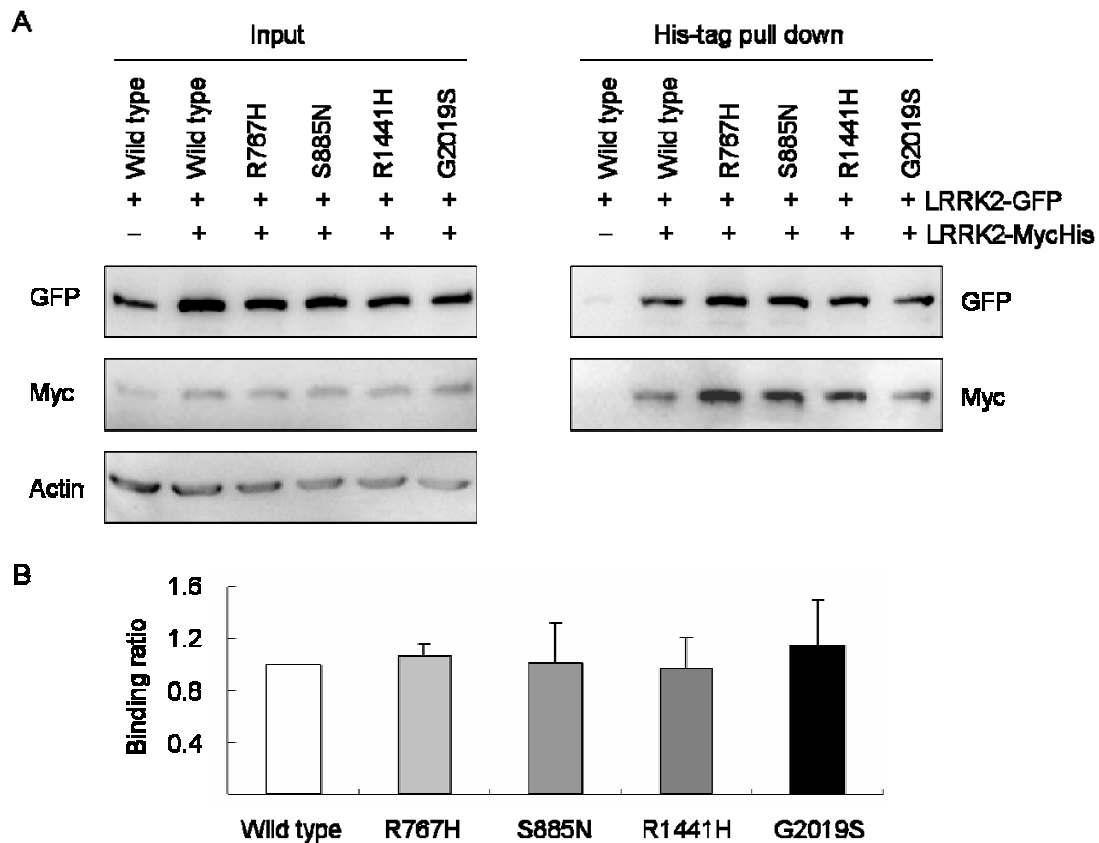
圖十三、活細胞影像儀觀察 LRRK2-EGFP 融合基因在 HEK-293T 細胞內蛋白聚集情形。pEGFP-N1 質體及野生型(WT)、突變型(R767H、S885N、R1441H、G2019S)的 LRRK2-EGFP 重組質體，經 lipofactamine 送入 HEK-293T 細胞中，隔天加入細胞週期抑制劑 oxaliplatin，表現 2 天、4 天及 6 天後，進行活細胞影像儀觀察蛋白聚集情形。



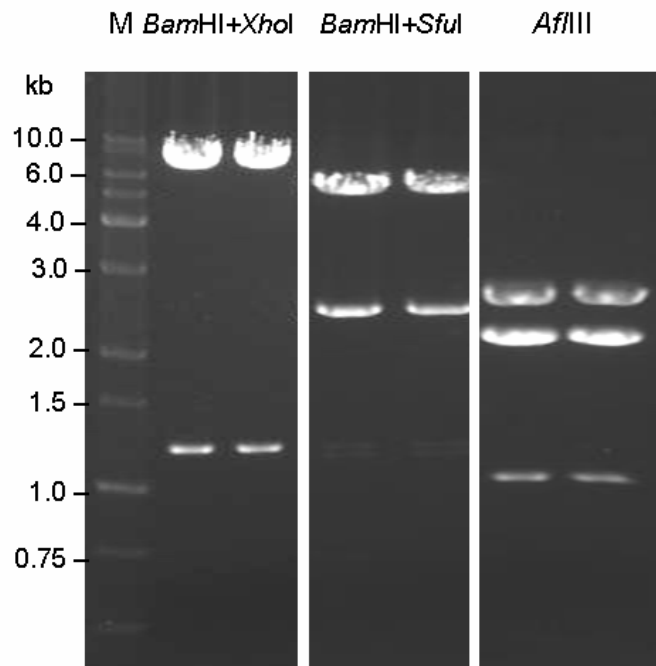
圖十四、LRRK2-Myc-His 重組質體的限制酵素圖譜分析及 Myc-His tag 定序圖。(A)野生型(WT)及突變型(R767H、S885N、R1441H、G2019S)重組質體經限制酵素切割(*EcoRV/XhoI*、*NotI/BamHI*、*BamHI/XhoI*、*XhoI/NotI*)後的 0.8%洋菜膠體電泳照片。Lane M 為 1 kb ladder 的大小標記。(B) Myc-His tag 定序圖，並標示出兩端引入的 *Bam*HI、*Xho*I 限制酵素切位。



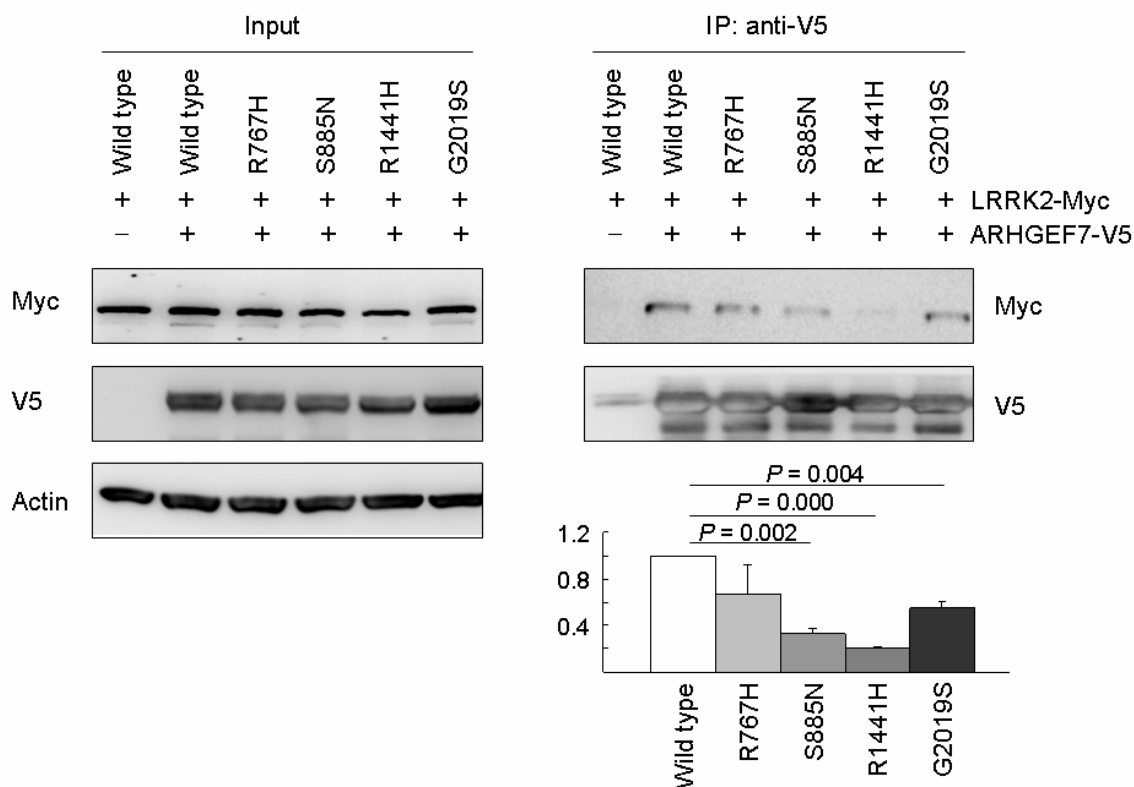
圖十五、LRRK2-Myc-His 融合蛋白的西方轉漬分析。pEGFP-N1、pcDNA3 載體及野生型(WT)、突變型(R767H、S885N、R1441H、G2019S)的 LRRK2 重組質體，經 lipofactamine 送入 HEK-293T 細胞中表現二天後，以 LRRK2、GFP、Myc、actin 等抗體進行西方轉漬分析的結果。



圖十六、LRRK2-Myc-His 與 LRRK2-EGFP 形成二元體的分析。(A) Myc-His 標記與 EGFP 標記的同型 LRRK2 重組質體共轉染 HEK-293T 細胞，另外共轉染 pcDNA3 載體及野生型(Wild type)的 EGFP 標記 LRRK2 重組質體作為負控制組，表現二天後，收總蛋白經 His 標記蛋白沉降試驗，以 GFP、Myc、actin 等抗體進行西方轉漬分析的結果。(B) 三次 His 標記蛋白沉降試驗的西方轉漬分析，經影像定量後以統計分析所作不同變異點的 LRRK2 二元體結合比例圖。



圖十七、ARHGEF7 cDNA 重組質體的限制酶圖譜分析。
 ARHGEF-V5-His 重組質體經限制酶 *Bam*HI、*Xho*I 和 *Bam*HI、*Sfi*I 雙
 切割與 *Afl*III 單切割後的 0.8% 洋菜膠體電泳照片，以確認結構的正
 確，。Lanes M 為 1 kb ladder，作為片段大小標記。



圖十八、ARHGEF7 與 LRRK2 蛋白的免疫共沉澱分析。Myc-His 標記的 LRRK2 重組質體與 V5-His 標記的 ARHGEF7 重組質體共轉染 HEK-293T 細胞，另外共轉染 pcDNA3.1/V5-His/lacZ 載體及野生型 (Wild type) 的 Myc 標記 LRRK2 重組質體作為免疫共沉澱負控制組。表現二天後，收總蛋白經免疫共沉澱分析，以 Myc、V5、actin 等抗體進行西方轉漬分析的結果。右下方為三次免疫共沉澱結果的定量統計分析。

表一、定點突變的 PCR 引子對

R767H (CGT>CAT)

F: CTGAATAGTGGATCTCATGAACAAGATGTACGAAAAGCG

R:CGCTTTTCGTACATCTTGTTCATGAGATCCACTATTCAG

S885N (AGT>AAT)

F: CCTGACTCTTCTATGGACAATTGTGTTTGCTCAAAG

R:CTTTGAGCAAACACATTTGTCATAGAAGAGTCAGG

R1441H (CGC>CAC)

F: AAGGCTCACGCTTCTTCTTCCCCTGTGATTCTCG

R:CGAGAATCACAGGGGAAGAAGAAGCGTGAGCCTT

R1628P (CGT>CCT)

F: CACCCTAAGGGCATTATTTCGCTAGAGATGTGG

R:CCACATCTCTAGGCGAAATAATGCCCTTAGGGTG

S1647T (TCA>ACA)

F: CTACATGTCACAGTATTTTAAGCTCCTAGAAAAATTCCAG

R:GCAATCTGGAATTTTTCTAGGAGCTTAAAATACTGTGACATGTAG

G2019S (GGC>AGC)

F: GCAAAGATTGCTGACTACAGCATTGCTCAGTACTGCTG

R: CAGCAGTACTGAGCAATGCTGTAGTCAGCAATCTTTGC

G2385R (GGA>AGA)

F: CTCTGTAGACTAATAGACTGCGTGCACTTTTTAAGGGAGG

R:CCTCCCTTAAAAAGTGCACGCAGTCTATTAGTCTACAGAG

M2397T (ATG>ACG)

F: GACTGCGTGCACTTTTTAAGGGAGGTAATGGTAAAAG

R:CTTTTACCATTACCTCCCTTAAAAGTGCACGCAGTC
