

肆、結果

一、*PPP2R2B* 基因 CAG 三核苷酸重複遺傳資料庫的擴充

本實驗共分析台灣地區六個不同樣品群的*PPP2R2B*基因三核苷酸重複，包括正常人族群(222 個個體、444 條等位基因)和運動失調症(16 個個體、32 條等位基因)、失智症(146 個個體、292 條等位基因)、帕金森氏症(156 個個體、312 條等位基因)、原發性顫抖症(102 個個體、204 條等位基因)及舞蹈症、肌張力異常症等其他疾病(45 個個體、90 條等位基因)患者，所觀察到的各樣品群的(CAG)*n*等位因數目詳列於表二。如圖三所示，正常人族群與各種神經退化性疾病患者間，*PPP2R2B*基因CAG重複數目的分布情形並無明顯差異，正常人族群CAG三核苷酸重複範圍為 9 ~ 29，最常見的等位基因為(CAG)₁₀ (25.7%)、(CAG)₁₃ (25.9%)和(CAG)₁₆ (20.7%)，CAG三核苷酸重複平均次數為 13.6 (標準差 3.1)。運動失調症、失智症、帕金森氏症、原發性顫抖症及其他神經退化性疾病樣品群中，最常見的等位基因亦為(CAG)₁₀ (23.5% ~ 34.4%)、(CAG)₁₃ (21.9% ~ 28.9%)和(CAG)₁₆ (11.1% ~ 25.0%)，各樣品群中CAG重複範圍/平均次數(標準差)分別為 10 ~ 18/13.4 (2.7)、9 ~ 27/13.5 (3.1)、10 ~ 26/13.5 (3.0)、5 ~ 26/13.5 (3.1)、6 ~ 26/13.2 (3.3)。在 4 位原發性顫抖症(2.0%)及 1 位舞蹈症(1.1%)患

者，觀察到短的(CAG)₅₋₇的等位基因。圖四為(CAG)₅、(CAG)₆等位基因的DNA定序結果。

二、PPP2R2B 基因啓動子的多型性分析

(一) -3170 C/T 多型性的 *Bsm*AI 切割檢測

*PPP2R2B*基因上游區遠端啓動子第-3170 個核苷酸由C轉變為T時，會使限制酶*Bsm*AI的切點(GTCTC)消失(表一)。故包含此多型性的PCR產物以限制酶*Bsm*AI進行切割時，C等位基因可切割出 135 bp 和 132 bp的片段，T等位基因則出現 267 bp的片段(圖五A)。

(二) -2923 A/G 多型性的 *Sph*I 切割檢測

*PPP2R2B*基因上游區遠端啓動子第-2923 個核苷酸由A轉變為G時，並未改變任何限制酶的切點，故利用誤配引子PCR引入一新的*Sph*I限制酶切點(GCATGC) (表一)。包含此多型性的PCR產物以限制酶*Sph*I進行切割時，A等位基因出現 401 bp的片段，G等位基因則可切割出 379 bp和 22 bp的片段(圖五B)。

(三) -1905 T/A 多型性的 *Hind*III 切割檢測

*PPP2R2B*基因上游區遠端啓動子第-1905 個核苷酸由T轉變爲A時，會產生一新的*Hind*III限制酶切點(AAGCTT) (表一)。故此PCR放大片段以限制酶*Hind*III進行切割時，T等位基因出現 151 bp的片段，A等位基因則可切割出 94 bp和 57 bp的片段(圖五C)。

(四) -428 A/G 多型性的 *Alu*I 切割檢測

*PPP2R2B*基因上游區近端啓動子第-428 個核苷酸由A轉變爲G時，會產生一新的限制酶*Alu*I的切點(AGCT) (表一)。故此PCR放大片段以限制酶*Alu*I進行切割時，A等位基因出現 74 bp的片段，G等位基因則可切割出 38 bp和 36 bp的片段(圖五D)。

(五) -428 A/G 多型性的 SSCP 分析

以 PCR 放大包含-428 A/G 多型性的螢光片段，於 SSCP 電泳分析時，若爲 GG 同型合子，可見泳動速度居間的構形片段 b、c；若爲 AA 同型合子，則見構形片段泳動速度較快及較慢的 a、d，若爲 AG 異型合子，則構形片段 a、b、c、d 皆可見(圖六)。

(六) 正常人族群 *PPP2R2B* 啓動子多型性的哈溫平衡及連鎖不平衡檢測

157 名正常人的 *PPP2R2B* 基因多型性分析結果列於表三。在檢查正常人的 290 ~ 314 條染色體中，各多型性之等位基因頻率介於 28.3 % 至 41.1 % 間。若依等位基因頻率及樣品總數算出期望之基因數與實際值比較，經 χ^2 分析，各多型性遺傳情形皆處於哈溫平衡 ($P = 0.733 \sim 0.996$)。另將正常人族群之 *PPP2R2B* 基因的 4 個多型性，兩兩配對進行單套型分析，檢驗各多型性點間的連鎖不平衡情形，表四結果顯示 -3170/-1905、-2923/-1905、-2923/-428、-1905/-428 間呈現強烈的連鎖不平衡 ($\chi^2 > 18.47$, $P < 0.001$, 自由度= 4)，其中以 -2923/-428 間最爲強烈 ($\chi^2 = 150.66$, $P = 1.47 \times 10^{-31}$, 自由度= 4)。

(七) 啓動子多型性與阿茲海默氏症、原發性顫抖症感受性相關性

220 名阿茲海默氏症病患、96 名原發性顫抖症病患與 157 名正常人的 *PPP2R2B* 基因多型性分析結果列於表五、表六。若針對阿茲海默氏症病患或原發性顫抖症病患與正常人族群之多型性基因型分佈、等位基因頻率以 χ^2 進行檢測，則各多型性點於病患與正常人族群間皆無顯著性差異 ($P > 0.016$)，顯示所檢測的 *PPP2R2B* 基因啓動子多型性與

阿茲海默氏症、原發性顫抖症發生並無相關性。

(八)多型性的 pairwise 聯鎖不平衡檢測及單套型分析

利用SNPSpD軟體聯鎖不平衡相關矩陣(Linkage disequilibrium correlation matrix)方式分別計算出-3170、-2923、-1905、-428多型性點的特徵值(eigenvalue, λ s)，特徵值愈大表示多型性點間具有高度相關性，若所有多型性點間完全相聯鎖，則第一特徵值會與多型性點的數目相同。表七中顯示四個特徵值介於0.16~2.50之間，且第一特徵值2.50與多型性點的數目($M = 4$)不接近，表示這四個多型性點並非完全相關(聯鎖)。利用LDMAX軟體進一步分析各多型性點間的Lewontin's standardized disequilibrium coefficients (D')及squared pairwise correlations (Δ^2)，如-2923和-428間 D' 值為0.84、 Δ^2 值為0.70。

表八顯示在阿茲海默氏症族群中，-3170/-2923/-1905/-428的單套型C-A-T-G出現頻率較正常人族群高(3.7% vs. 0.8%)， χ^2 檢測接近顯著差異($P = 0.017$ ，自由度=1)，帶有C-A-T-G單套型者呈現較高的AD罹患風險(Odds ratio = 5.99, 95% CI: 1.64-38.4, $P = 0.019$)。表九顯示原發性顫抖症族群與正常人族群相較，-3170/-2923/-1905/-428的各單套型頻率 χ^2 檢測結果並沒有顯著差異，且亦無呈現較高的tremor罹病風險。

三、*PPP2R2B* 基因啓動子的轉錄活性分析

(一) pGL3-TK-B β 1 重組質體的確認

用限制酵素 *Eco*RI、*Hind*III 切割，來確認 pGL3-TK-B β 1 以及 pGL3-TK-PPP2R2B 質體結構。如圖七 A 所示，此兩個啓動子質體經限制酶 *Eco*RI 切割後，4 kb 的遠端啓動子片段(-4070 ~ +23)分別包含在 3.0、1.1 kb 片段上(lanes 1 and 2)，0.9 kb 的近端啓動子片段(-870 ~ +23)包含在 0.9 kb 片段上(lane 3)，pGL3-TK 質體及 HSV-TK-*Renilla luciferase* 基因則包含在 5.5、1.4kb 片段上(lane 1~3)。圖七 B 爲 *Hind*III 切割後的洋菜膠體電泳照片，4 kb 的遠端啓動子片段及 *Renilla luciferase* 分別包含在 4.8、0.7 kb 片段上(lanes 1 and 2)，0.9 kb 的近端啓動子片段及 *Renilla luciferase* 包含在 1.6、0.7 kb 片段上(lane 3)，pGL3-TK 質體及 HSV-TK 啓動子則包含在 5.5 片段上(lanes 1~3)。

(二) pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)_n 重組質體的確認

用限制酵素 *Eco*RI、*Hind*III 切割，來確認 pGL3-TK-PPP2R2B 分別帶有(CAG)₅、(CAG)₆、(CAG)₇ 啓動子多型性的質體結構。如圖八 A

所示，經限制酶*EcoRI*切割後，0.9 kb的啓動子片段(-870 ~ +23)包含在約 0.9 kb片段上，pGL3-TK質體及HSV-TK-*Renilla luciferase*基因則包含在 5.5、1.4 kb片段上。圖八B為*HindIII*切割後的洋菜膠體電泳照片，約 0.9 kb的啓動子片段及*Renilla luciferase*包含在 1.6、0.7 kb片段上，pGL3-TK質體及HSV-TK啓動子則包含在 5.5 kb片段上。

(三)啓動子的轉錄活性分析

經限制酵素切割確定重組質體無誤之後，轉移入HEK-293、IMR32、SK-N-SH三種細胞株中，檢測啓動子的轉錄活性。若將近端啓動子pGL3-TK-PPP2R2B-(CAG)₁₆ (侯，2005)所表現的活性設為 1，遠端啓動子在HEK-293、IMR32、SK-N-SH細胞中的相對活性分別為 0.85 ($P = 0.014$)、0.82 ($P = 0.013$)、0.89 ($P = 0.079$)，即在HEK-293、IMR32 細胞中，*PPP2R2B*遠端啓動子的轉錄活性顯著低於近端啓動子(圖九)。

(四)低重複啓動子的轉錄活性分析

經定序確定含有不同CAG重複次數的重組質體無誤之後，轉移入HEK-293、IMR32、SK-N-SH三種細胞株中，檢測多型性啓動子的轉錄活性。若將pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₁₆ (侯，2005)所表現的活性設

爲 1，pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₅ 在 HEK-293、IMR32、SK-N-SH 細胞中的相對活性分別爲 0.63 ($P = 0.007$)、0.48 ($P = 0.001$)、0.62 ($P = 0.010$)，即在三種細胞株中 CAG 重複次數爲 5 時，啓動子活性皆顯著低於正常 CAG 重複次數 16；pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₆ 在 HEK-293、IMR32、SK-N-SH 細胞中的相對活性分別爲 0.79 ($P = 0.001$)、0.44 ($P = 0.001$)、0.56 ($P = 0.005$)，即(CAG)₆ 在三種細胞中啓動子活性亦皆明顯低於(CAG)₁₆；而 pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₇ 在 HEK-293、IMR32、SK-N-SH 細胞中的相對活性分別爲 0.77 ($P = 0.040$)、0.41 ($P = 0.000$)、0.64 ($P = 0.020$)，(CAG)₇ 在三種細胞中啓動子活性亦顯著低於(CAG)₁₆ (圖十)。