

伍、討論

本研究根據本實驗室先前所建立的國人正常人族群及帕金森氏症、失智症、運動失調症等患者族群的 *PPP2R2B* 基因 CAG 三核苷酸重複的遺傳資料庫，繼續擴大各樣品群，並新增震顫患者族群，以了解在上述病患及正常人族群中，此 SCA12 *PPP2R2B* 基因 CAG 三核苷酸重複次數分佈是否有差異。其次探討 *PPP2R2B* 啟動子上-3170 C/T、-2923 A/G、-1905 T//A、-428 A/G 多型性變異，是否與台灣人的阿茲海默氏症、原發性顫抖症的感受性相關，並分析遠端啟動子的轉錄活性。

一、台灣地區 *PPP2R2B* 基因 CAG 三核苷酸重複之遺傳資料庫

本研究分析了 16 個運動失調症患者、146 位失智症患者、156 個帕金森氏症患者、102 個原發性顫抖症患者、45 個舞蹈症及肌張力異常症患者，並未發現 CAG 三核苷酸重複不正常擴增的情形，各病患樣品群其 CAG 三核苷酸重複分佈情形與正常人族群相似(表二、圖二)。歸納上述樣品群的分析結果，在台灣的正常人族群中，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%)。在印度、法國、義大利、波蘭，

CAG三核苷酸重複範圍為 7 ~ 31 或 9 ~ 45、9 ~ 18、8 ~ 21、9 ~ 23，最常見的(CAG)₁₀等位基因頻率為 43%或 48%、60%、55%、66% (Fujigasaki *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 2001; Brusco *et al.*, 2002; Sulek *et al.*, 2004)。我們的族群中，CAG三核苷酸重複較大的對偶基因(>15)比例較高，此結果亦見於Tsai等人對台灣人族群的研究結果(Tsai *et al.*, 2004)。

先前本實驗室在另一失智症樣品群中，發現短的(CAG)₇的等位基因(2.8%) (侯，2005)，本研究並未在失智症樣品群中觀察到(CAG)₇的等位基因，但在原發性顫抖症樣品群中，觀察到(CAG)₅ (共 0.5%)、(CAG)₇ (共 1.5%)的等位基因。(CAG)₇等位基因並不常見，在文獻上僅被報導過 2 次，分別是包含歐裔正常人及神經性疾病患者(亨汀頓氏舞蹈症、帕金森氏症、運動失調症)的 2986 等位基因(Holmes *et al.*, 1999)、一印度正常人族群的 270 等位基因(Srivastava *et al.*, 2001)。此等位基因所佔比例不高，但先前本實驗室的研究發現包含(CAG)₇的啟動子活性僅為較常見的(CAG)₁₀、(CAG)₁₃、(CAG)₁₆啟動子活性的 60% (侯，2005)，故推論CAG短重複次數與原發性顫抖症的易感受性可能相關。可進一步比較在此次實驗中觀察到的(CAG)₅、(CAG)₆其啟動子活性是否會因重複次數減少而降低其活性。

二、*PPP2R2B* 基因啓動子多型性分析

PPP2R2B 基因啓動子上游四個多型性點-3170 C/T、-2923 A/G、-1905 T/A、-428 A/G 爲新穎的(novel)多型性，未曾被報導過，本研究係利用網路序列的比對而發現。正常人族群的各多型性基因型的遺傳情形皆處於哈溫平衡(表三)，顯示本研究中取樣的正常人族群可自由婚配、配子可隨機地結合，且不因突變、遷徙或天擇等演化力量而影響基因頻率的分佈。連鎖不平衡分析方面，基因計算方法(Hill, 1974)的單套型分析顯示，-3170/-1905、-2923/-1905、-2923/-428、-1905/-428 間呈現連鎖不平衡，其中以-2923/-428 間最爲強烈(表四)。可能因爲這些連鎖情形存在於我們的創始者族群(founding population)，由於重組率低，連鎖情形至今仍大致被保留下來。

各單一鹼基多型性點其基因型分佈(表五)或等位基因頻率(表六)，在阿茲海默氏症患者或原發性顫抖症患者跟正常人族群相較之下是沒有顯著差異。單套型分析顯示，-3170 C / -2923 A / -1905 T / -428 G 單套型可能與阿茲海默氏症的感受性相關(表八，Odds ratio: 5.99 ; $P = 0.019$)。原發性顫抖症患者中，無論哪一型的單套型與正常人族群相較並不會造成對疾病的易感受性。先前介紹過在中國地區發現 APP 基因啓動子上的三個單一鹼基多型性點，作者於 pGL3-Basic

質體內裝製了不同單套型，其中以-877T/-955A/-9G (homozygote)轉移到神經瘤細胞中的轉錄活性是-877C/-955G/-9G 單套型的三到四倍高，加入 Amyloid β 處理亦有明顯提高此單套型的轉錄活性；證實擁有-877T/-955A 單套型之個體會增加罹患阿茲海默氏症的風險。在 *PPP2R2B* 基因啓動子上，我們也可挑出以 JMP 及 PHASE 軟體計算出與阿茲海默氏症感受性相關的單套型組合(-3170C/ -2923A/-1905T/ -428G)，架構於 pGL3-TK 質體中，檢測擁有不同單套型的 *PPP2R2B* 基因啓動子之轉錄活性是否具顯著差異來證實統計資料結果，來做為後續實驗方向。

三、*PPP2R2B* 基因啓動子的轉錄活性分析

本實驗分析帶有*PPP2R2B*基因不同啓動子長度的重組質體之轉錄活性差異，含有*PPP2R2B*基因-870 ~ +23 近端啓動子的重組質體所表現的轉錄活性，可調節*PPP2R2B*基因的基礎表現量(侯，2005) ，且活性高於-4070 ~ +23 遠端啓動子的重組質體(圖九)。在大鼠的 *BACE1* 基因啓動子轉錄活性實驗中，750 bp長的啓動子所表現的轉錄活性是 1.5 kb長啓動子的兩倍之多，其確切轉錄調節區域位於-514 ~ -753，啓動子上游-754 之後存在轉錄抑制子GATA-1 的結合位置，故 1.5 kb啓動子的轉錄活性反而更低(Lange-Dohna *et al.*, 2003)。故假

設*PPP2R2B*啓動子在-870 上游到-4070 之間存在可能調節組織特異性的轉錄活性調節區域之外，也許還存在著轉錄抑制子的結合區位。可進一步製備含有啓動子不同缺失片段的重組質體，轉移至HEK-293、IMR32、SK-N-SH細胞株中，利用比較luciferase表現量來偵測出啓動子 -870 上游調節組織特異性的調控區域。

之前以 TFSEARCH 線上軟體分析 *PPP2R2B* 基因啓動子序列，發現在本研究所發現新穎的單一鹼基多型性 -3170 C/T 在轉錄因子 HNF-3 β 之結合序列上(Overdier *et al.*, 1994)，但在多型性分析實驗中，-3170 C/T 在病人跟正常人之間並沒有統計上的差異。我們預定製備分別帶有-3170 C 和-3170 T 不同鹼基變異的序列，以及帶有 HNF-3 β cDNA 序列的表現質體，在純化出 HNF-3 β 蛋白後，檢測與帶有不同鹼基變異的序列可有專一性之結合，以此觀察轉錄因子 HNF-3 β 在細胞層次上對於 *PPP2R2B* 基因啓動子的轉錄有無專一的調控影響。

四、*PPP2R2B* 基因低啓動子的轉錄活性分析

此次進行低重複啓動子(CAG)₇之轉錄活性明顯低於常見的(CAG)₁₆啓動子之實驗結果與侯於 2005 年所作之結果相同，但此實驗加入在原發性震顫患者發現的(CAG)₅以及在舞蹈症患者中發現的

(CAG)₆，與(CAG)₇及(CAG)₁₆一同比較低重複啓動子與正常啓動子之轉錄活性之差異。(CAG)₅、(CAG)₆、(CAG)₇低重複啓動子於三種細胞中之轉錄活性皆相當接近，但與常見的(CAG)₁₆啓動子比較時，皆顯示具有顯著差異存在(圖十)。故實驗結果顯示當CAG三核苷酸重複次數爲5~7時，其啓動子的轉錄活性會顯著降低，但重複次數5、6、7間並無明顯差異存在。在先前之研究證實患有家族性震顫疾病之病人其CAG重複次數皆不超過19 (Nicoletti *et al.*, 2002)，但未知特別短的CAG重複片段是否與原發性震顫疾病有相關性存在。