

## 壹、緒論

### 一、脊髓小腦共濟失調症(SCA)

脊髓小腦共濟失調症(spino-cerebellar ataxia；簡稱 SCA)是一群體染色體顯性遺傳的神經退化疾病；這類型疾病的共同症狀為小腦萎縮退化造成的行動失調、步履不穩，所以這類疾病一般也稱「小腦萎縮症」。除了小腦萎縮外，這類疾病患者在其中樞或周邊神經系統的其他部位亦會出現損傷。雖然 SCA 存在典型病徵，但臨床上仍無法藉由病徵的辨別，來判定為何種類型的 SCA 患者，需要加上分子層次的診斷來界定。目前共有 28 種類型 SCA 被報導，包括：SCA1-28 (Cagnoli et al., 2006; Hellenbroich et al., 2005)；而台灣最常見的 SCA 病患則是 SCA3 的患者(Soong et al., 2001)。

在已知突變基因的 SCA 類型中，大部分的 SCA 以 CAG 三核苷為重複單位，位於轉譯區的 CAG 可轉譯出麩醯胺酸(glutamine，簡稱 Q)，如 SCA1、2、3、6、7、17 等(Orr et al., 1993; Kawaguchi et al., 1994; Koide et al., 1999; Imbert et al., 1996; David et al., 1997; Zhuchenko et al., 1997)。當致病基因 CAG 三核苷酸重複擴增時，擴增次數會影響病患發病的年齡及臨床症狀，即擴增次數愈多發病年齡愈早且愈嚴

重。擴增的 CAG 三核苷重複基因經轉錄(transcription)、轉譯(translation)生成帶有多麩醯胺酸(polyQ tract)的蛋白質產物，對神經細胞造成毒害，最後產生運動失調等症狀(McCampbell et al., 2000; Perez et al., 1998; Yamada et al., 2001)。

除上述 polyQ 的 SCA 外，SCA10 是由在致病基因內含子(intron)部分的 ATTCT 五核苷重複擴增所導致(Matsuura et al., 2000)，SCA12 是由在致病基因 5'端非轉譯區(5' untranslated region ; 5'UTR)的 CAG 三核苷重複擴增所導致(Holmes et al., 1999)，SCA8 則是由在致病基因 3'端非轉譯區(3'UTR)的 CTG 三核苷酸重複擴增所導致(Koob et al., 1999)。

## 二、第八型脊髓小腦共濟失調症(SCA8)

第八型脊髓小腦共濟失調症(spinocerebellar ataxias type 8；簡稱 SCA8)是在 1999 年由 Koob 等學者首先報導，由染色體 13q21 的 SCA8 基因其 3'UTR 的 CTG 三核苷酸重複擴增所造成(Koob et al., 1999)。SCA8 患者在臨床病徵方面有痙攣、震顫、步伐不穩、手腳不協調、發音困難及呼氣緩慢的情形，有時候也會有智能障礙的病徵出現。

SCA8 的發病年齡分布在 18~65 歲之間，平均值約為 39 歲，屬於晚發性之遺傳性疾病，故病患在病發時通常過了正常生育年齡，而已經有了下一代，而造成家族遺傳。此外，Koob 等學者也發現由母親遺傳來的穿透度(penetrance)較高，亦即由母親遺傳來的 CTG 重複會有擴增的現象(Koob et al., 1999)。此外，有報導指出在某些男性病患的體細胞和精子內的 CTG 重複次數不同，在精子內的 CTG 重複次數有縮減的現象(Moseley et al., 2000)，但詳細的縮減機制目前仍然不明。另外在 SCA8 也有 anticipation 的現象，即當擴增的致病基因傳給子代時，子代的發病年齡會較親代提早且病情也較為嚴重。

### 三、SCA8 基因

SCA8 基因的 3'UTR 含有 CTA/CTG 重複序列(CTA/CTG combined repeat ; CR)，通常以  $(CTA)_{1-21}(CTG)_n$  形式來表示(Stevanin et al., 2000)；亦即在 SCA8 locus 上具有多型性(polymorphism)的現象，而  $(CTA)_{1-21}$  在遺傳上比  $(CTG)_n$  具有更高的穩定性(Koob et al., 1999; Stevanin et al., 2000)，經過世代遺傳子代仍然擁有和親代相同的  $(CTA)_{1-21}$  重複次數。正常族群在 SCA8 對偶基因中會有 16-92 個 CRs，其中 99% 以上含有 16-37 個 CRs ( $n = 1200$ ) (Stevanin et al., 2000)，而 SCA8 患者通常 CRs 數目會介於 100 -250 個之間。另外也有從患者身上觀察

到SAC8 基因會呈現不間斷的CTG重複序列，或是在基因中插入單個或多個CCG、CTA、CTC、CCA、CTT等情形發生(Ikeda et al., 2000; Juvonen et al., 2002; Schols et al., 2000; Silveira et al., 2000)。從1999年Koob報導後，英國、芬蘭、法國、德國、南斯拉夫、西班牙、義大利、美國、巴西和日本等國學者在研究此基因座時也發現不同國籍的家族中，病患SCA8 基因的CTG擴增數目差異性很大(Cellini et al., 2001; Ikeda et al., 2000; Ikeda et al., 2000; Juvonen et al., 2002; Moseley et al., 2000; Schols et al., 2000; Silveira et al., 2000; Sobrido et al., 2001; Tazon et al., 2002)，因此SCA8 基因CTG重複擴增之致病範圍仍不確定。此外，由於SCA8 基因在CTG重複片段存在有選擇性裁接法(alternative splicing)，因此不是每個個體都會轉錄出帶有此重複序列的mRNA，這種情形也使得要研究SCA8 的致病機轉更加複雜。

SCA8 基因的 mRNA 5'端和 *KLHL1* (*Kelch-like 1*) 基因的 mRNA 5'端互補(自轉譯起始處至第一個 intron)，故 SCA8 基因也會被表示為 *KLHL1AS* 基因，AS 即為反義 RNA (antisense RNA) 的意思(Nemes et al., 2000) (圖一)。*KLHL1* 基因和果蠅中的 *kelch* 基因在蛋白質結構上有高度相似性(homology) (Robinson and Cooley, 1997)，因而推測 *KLHL1* 基因的功能應與 *kelch* 基因類似，藉由 KLHL1 蛋白質和肌動蛋白(actin) 結合進一步維持細胞骨架的完整。SCA8 基因和 *KLHL1* 基因互補的情

形，可在老鼠的基因體結構中看見同樣的結果(Benzow and Koob, 2002)；這樣高度的演化保守性(evolutionary conservation)暗示了 *SCA8* 基因和 *KLHL1* 基因對於正常的生理機能維持很重要，而 *SCA8* 基因可能藉此 antisense RNA 機制，來調節 *KLHL1* 基因的表現。

#### 四、DNA 甲基化對基因表現的影響

DNA 的甲基化(methylation)可藉由影響染色質絲的結構(chromatin structure)，進而降低基因的轉錄活性(Boyes and Bird, 1992)，是目前公認的確會使基因表現量下降的原因之一。最近 Tufarelli 等學者報導，指出  $\alpha$  型海洋性貧血( $\alpha$ -thalassemia)患者因為 *LUC7L* 基因的缺失突變(deletion mutation)，產生反義 RNA，而導致鄰近正常的 *HBA2*  $\alpha$ -globin 基因不表達(Tufarelli et al., 2003)。這種基因沈默(gene silence)和 CpG 島(CpG island)的甲基化有關。*SCA8* 基因所轉錄出的 antisense RNA 和 *KLHL1* 基因表現的 RNA，是否可能透過此種機制調節鄰近基因的表現，為一值得探討的問題。

過去的研究顯示，基因體中的核苷酸重複在經過世代交替遺傳後會有不穩定的現象，這些以大腸桿菌、酵母菌、哺乳類細胞及小鼠為材料的研究中，嘗試由兩種觀點來探討造成核苷酸重複不穩定的現

象；一方面由 *cis-elements* 角度：例如核苷酸重複的片段長度、重複單位的單純度或是核苷酸重複的轉錄方向等(Cleary et al., 2002; Freudenreich et al., 1997; Rolfsmeier et al., 2001; Veeraraghavan et al., 2003)，或是由 *trans-acting factors* 的角度，如 DNA 的修補(repair)或是複製(replication)蛋白等(Iyer et al., 2000; Kovtun and McMurray, 2001; Liu and Bambara, 2003; Manley et al., 1999; Richard et al., 2000; Rolfsmeier et al., 2000; van den Broek et al., 2002)，即使經過了這麼多的研究，造成世代間的重複不穩定性(intergenerational repeat instability)的機制仍不清楚。在 2004 年，有學者提出 DNA 的去甲基化(demethylation)會使 CTG · CAG 三核苷酸重複次數變的不穩定(Gorbunova et al., 2004)，即 DNA 的甲基化可能和三核苷酸重複的穩定性有關。由於 *SCA8* 基因和 *KLHL1* 基因重疊序列上富含 CpG 島(圖二)，故 DNA 的甲基化與 *SCA8* 的相關性，也是一個值得探討的問題。

## 五、淋巴細胞株的氧化壓力研究

從 1977 年起，Epstein-Barr Virus (EBV)就被用來感染人類的淋巴細胞來從事研究工作(Henderson et al., 1977; Sugden and Mark, 1977)。在SCA患者的淋巴細胞株研究方面，在 2003 年有學者在SCA3病人的淋巴細胞株中發現熱休克蛋白 27 (heat shock protein 27; HSP27)

的表現量有下降的情形(Wen et al., 2003), HSP可幫助蛋白質的正常折疊, 功能和細胞內蛋白質的結構和活性維持有關。熱休克蛋白 27 在杭丁頓氏症(Huntington's disease ; HD)細胞模式中被發現可以抑制由 polyQ引起的細胞死亡(Wytenbach et al., 2002), HSP27 可降低表現突變 huntingtin 蛋白細胞中的活性氧物質(reactive oxygen species ; ROS), 由此我們可以推論HSP27 參與細胞面對氧化壓力的反應。此外, 在HD的轉殖小鼠模式研究中, 也發現了在腦中紋狀體(striatum)區域的氧化傷害增加(Perez-Severiano et al., 2000), 而一氧化氮(nitric oxide ; NO)除了參與在此氧化性傷害的形成過程外, 也影響了神經退化出現的時間(Perez-Severiano et al., 2002)。在麩氨基硫耗盡(Glutathione-depletion-induced)或過氧化(peroxide-induced)所造成的氧化壓力都可顯著提高神經細胞中Sp1 的乙醯化(acetylation) (Ryu et al., 2003); Sp1 的大量表現, 可以讓細胞對抗氧化壓力和其造成的氧化傷害, 而對於細胞存活有所幫助, 但突變的huntingtin蛋白可以阻擋Sp1 and TAF<sub>II</sub>130 進一步妨礙細胞產生適應氧化壓力的反應, 最後造成細胞死亡(Ryu et al., 2003)。在本研究中, 我們將利用SCA8 病人的淋巴細胞株來進行氧化壓力相關的研究。

## 六、研究動機

自 1999 年以來，*SCA8* 基因的 CTG 重複擴增現象除了出現在遺傳性和偶發性的運動失調患者外，亦被報導於帕金森氏症(Parkinson's disease ; PD)、阿茲海默氏症(AD)、Friedreich's 運動失調症等退化性神經疾病及精神病患者(psychiatric disorder)，和極少數正常人(Zeman et al., 2004)。先前實驗室學長姐已經進行初步的分析，亦發現在台灣的 PD 患者的 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增(Wu et al., 2004)。本研究繼續擴大建立包括正常人族群、運動失調症患者、失智症患者、PD 患者及其他神經疾病患者族群 *SCA8* 基因 3'UTR CTG 重複次數的遺傳資料庫，並利用 RT-PCR 的技術來分析正常人和 CTG 重複擴增病患的淋巴細胞株中，*SCA8* 基因和 *KLHL1* 基因的表現。在偵測到 *SCA8* 基因在淋巴細胞有表現後，我們將利用正常人和 *SCA8* 患者的淋巴細胞，進行氧化壓力相關的研究。在外遺傳研究方面，我們將會分析正常人和 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者，其 *SCA8* 基因和 *KLHL1* 基因重疊序列上的 CpG 島的甲基化情形，及鄰近區域的基因體結構，來探討外遺傳變化和 *SCA8* 致病機轉的相關性。