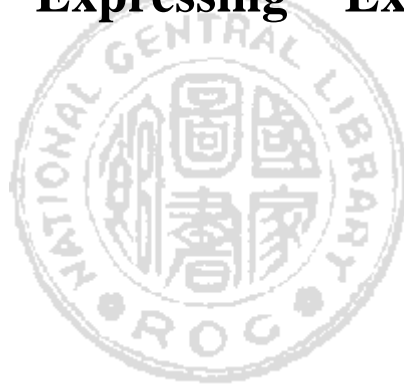


第一章

穩定表達全長倍增 Machado-Joseph Disease 蛋白之人類神經腫瘤母細胞株建立

Establishment of Human Neuroblastoma Cell Line Stably Expressing Expandand MJD Protein



中文摘要

Machdo-Joseph Disease (MJD) 是屬於體染色體顯性遺傳神經退化性疾病其中一種，又名為小腦脊髓運動失調症第三型(SCA3)，發病原因與其基因座內 CAG 三核 酸重覆序列倍增突變有關。而對於此段核酸重覆序列所轉譯出的多醯胺麩胺酸(polyglutamine)的蛋白產物之正常功能與致病機轉尚未明瞭。只知道此段核酸重覆序列愈長則病症愈嚴重；而且經由病人腦部切片以細胞免疫染色實驗得知 MJD/ataxin-3 蛋白會聚積於腦部神經核內形成包涵物(inclusion body)，並猜測此核內包涵物會影響神經退化的病程發展。而核內包涵物究竟是促使神經細胞走向細胞程序性凋亡(apoptosis)亦或是保護神經細胞其作用並不清楚。本實驗中是將會表達全長 MJD 致病蛋白的質體藉由脂蛋白包裹的方式送入人類神經腫瘤母細胞中，由於此質體本身具有 G418 抗藥性基因，所以於培養液中添加 G418 藥物，若此質體 DNA 能嵌入人類神經腫瘤母細胞的染色體 DNA 中，長期培養後可以篩選出可穩定表達 MJD 致病蛋白的細胞株。實驗結果篩選三株可存活於含 G418 藥物培養液的人類神經腫瘤母細胞株。進一步以西方點墨法實驗證明其中一株人類神經腫瘤母細胞可偵測到全長 MJD 致病蛋白產生。而所篩選出可存活含 G418 藥物培養液的人類神經腫瘤母細胞經 11 代的繼代培養，以細胞免疫染色實驗目前尚無發現核內包涵物的形成。

英文摘要

(Abstract)

Machado-Joseph disease(MJD) is an autosomal dominant spinocerebellar degeneration characterized by cerebellar ataxia and pyramidal signs associated in varying degrees with a dystonic-rigid extrapyramidal syndrome or peripheral amyotrophy as major neurologic signs. Unstable CAG trinucleotide repeat expansion in MJD gene has been identified as the pathologic mutation of MJD. It is known that expanded polyglutamine tracts cause ataxin-3 and other proteins to accumulate and aggregate in neuronal nuclei. Whether the intranuclear aggregation of a polyglutamine protein initiates cellular pathology remains controversial.

In this study, we established stably transfected human neuroblastoma SK-N-SH cells expressing the full length of ataxin-3 with expanded polyglutamine (78Q), named SK-N-SH-MJD78. Western blot analysis and immunostaining experiments demonstrated that the expanded ataxin-3 is stably expressed and predominantly present in the cytoplasm. Compared to parental SN-K-SH cells expressing 26Q, cells expressing 78Q display normal morphology. No intranuclear aggregation was

observed in SK-N-SH-MJD78 cells after 11 passages.

Further analysis will apply to this cellular model to better understand the role(s) of other environmental stress may play in the pathogenesis of MJD.

序論

(Introduction)

近年來發現至少有十一種疾病與三核 酸重覆序列 (trinucleotides repeat) 有關 (Sutherland and Richaeds, 1995)。不穩定的三核 酸序列所造成的疾病可分為二類：第一類是位於轉譯區 (translated region) 中 CAG 三核 酸重覆序列倍增突變轉錄出一段多醯胺麩胺酸蛋白，所造成的神經退化性疾病 (neurodegeneration disease)，包括亨汀頓氏舞蹈症 (Huntington's Disease ; HD) (Andrew et al., 1993 ; Duyao et al., 1993 ; Snell et al., 1993)、小腦脊髓運動失調症第一型 (Spinocerebellar ataxia type 1 ; SCA1) (Joice et al., 1994 ; Ranum et al., 1994)、小腦脊髓運動失調症第二型 (Spinocerebellar ataxia type 2 ; SCA2) (Pulst et al., 1996 ; Sanpei et al., 1996 ; Imbert et al., 1996)、小腦脊髓運動失調症第三型 (Spinocerebellar ataxia type 3 ; SCA3/Machdo-Joseph Disease ; MJD) (Kawaguchi et al., 1994 ; Maciel et al., 1995)、小腦脊髓運動失調症第六型 (Spinocerebellar ataxia type 6 ; SCA6) (Zhuchenko et al., 1997)、小腦脊髓運動失調症第七型 (Spinocerebellar ataxia type 7 ; SCA7) (David et al., 1997a) 延髓肌萎縮症 (Spinal and bulbar muscular atrophy) (La Spada et al., 1992)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral-Pallidouysian atrophy ; DRPLA/Haw River Syndrom ; HRS) (Koide et al., 1994) (表一)。上述的幾種神經退化性疾病經由北方點墨法分析 RNA 表達發現並沒有組織特異性存

在，除了遍佈於腦部之外，肺、肝、腎等組織也會出現。目前只知此類疾病基因中三核 酸重覆序列倍增突變呈現中度不穩定，CAG 重覆序列最多可達到 200 次以上，且其病徵會造成專一的神經退化 (neurodegeneration)。第二類是位於不轉譯區(untranslated region)內，由不穩定的 CGG 或 CTG 及位於插入子(intron)中 GAA 三核 酸重覆序列倍增突變所造成的疾病，包括易脆 X 染色體症候群(Fragile X Syndrome) (Verkerk et al., 1991)、肌強直萎縮症(Myotonic Dystrophy ; DM) (Mahadevan et al., 1992)、Friedreich's ataxia (FA) (Campuzano et al., 1996)及小腦脊髓運動失調症第八型(Spinocerebellar ataxia type 8 ; SCA8)(Michael et al., 1999)等，此類疾病基因中三核 酸重覆序列倍增突變極為不穩定，可重覆上百次或上千次，此類基因突變會引起肌肉萎縮、智障、神經退化等臨床症狀相異的遺傳疾病，致病機制可能為相關的 RNA 或蛋白質的量降低，導致正常蛋白功能的喪失。

Machado-Joseph Disease (MJD)/SCA3 是一種晚發性的體染色體顯性(autosomal dominant)遺傳疾病 (Nakano et al., 1972)，在 1972 年首先在葡萄牙人 Willim Machado 的後裔被發現，而後在 1976 年 Rosenberg 等人在移民美國的葡萄牙人身上發現一種 Joseph disease，其後發現這兩種疾病是同一種漸進性神經退化性疾病 (Progressive neurodegenerative disease)，而後在世界各地陸續發現有此疾病的出現；如美國 (Healton et al., 1980)、日本 (Sakai et al., 1983)、義大利 (Livingstone and Sequeiros, 1984)等。MJD 是一種漸進性神經退化性疾病，此疾病的徵狀在臨床上變化很多，顯現範圍

很廣,主要病徵有:運動失調(ataxia)、漸進性眼外肌麻痺(progressive external ophthalmoplegia)、錐體及外錐體路徑的病徵(pyramidal and extra pyramidal signs)、肌張力的異常及僵硬(dystonia with rigidity)、末梢肌萎縮(distal muscular atrophies)、臉部及舌的顫搐(facial and lingual fasciculation) (Coutinhon et al., 1977 ; Lima and Coutinho, 1980)。早期對 MJD 的研究方向著重於臨床症狀、病理變化。近年來由於分子生物學的發展,在 1993 年 Takiyama 等人利用基因連鎖(linkage analysis)的方法,從日本人的家族中找到 MJD 的基因座落於第 14 對染色體長臂上(14q24.3-q32) (Takiyama et al., 1993)。1994 年由 Kawaguchi 等人在第 14 對染色體長臂上選殖出 MJD 的基因位於 14q32.1,稱為 MJD1 基因。而且在 MJD 患者的基因中發現在靠近 3'端轉譯區(translated region)內,有一段不穩定的 CAG 核酸重覆序列倍增突變。而這段 CAG 核酸重複序列會轉譯出一段含多個醯胺酸(polyglutamine)的蛋白質。於 1995 年後陸續有多篇關於 CAG repeat 與 MJD 臨床疾病的報告,例如擴張重複序列的長度會影響疾病的發病年齡(age at onset),其 p(CAG)n 的 n 值越大,發病年齡也就越早,但是也有 n 值小,但發病年齡較預測提前、因此 CAG 重覆序列數目不能完全解釋發病年齡早晚。此病在兩代間有輕微的不穩定的 CAG repeat 遺傳,也就是說雙親傳給子代的 p(CAG)n 有的會增加,有的會減少,而且父親比母親更影響後代 p(CAG)n 的遺傳數目改變(Maciel et al., 1995; Maruyama et al., 1995; Takiyama et al., 1995)。

在正常個體中，此基因中包含 13~44 個 CAG 核酸重覆序列，在 MJD 患者中則有 72~85 個 CAG 核酸重覆序列，而這段 CAG 核酸重覆序列會轉譯出一段含多個醯胺麩胺酸(polyglutamine)的蛋白質。目前對於多個醯胺麩胺酸(polyglutamine)蛋白產物之正常功能與致病機轉尚未明瞭。在 HD (Andrew et al., 1993 ; Duyao et al., 1993 ; Snell et al., 1993)、DRPLA (Koide et al., 1994)、SCA 1 (Jodice et al., 1994 ; Ranum et al., 1994)、SBMA (La Spada et al., 1992)、MJD (Maruyama et al., 1995 ; Maciel et al., 1995)、SCA 2 (Pulst et al., 1996 ; Sanpei et al., 1996 ; Imbert et al., 1996)及 SCA 7(David et al., 1997)研究中，發現 CAG 重覆次數與發病年齡呈負相關，即 CAG 重覆次數越多，發病年齡越早，臨床症狀也較明顯，而且親代間遺傳有不穩定現象，即雙親傳給子代的(CAG)_n 有的會增加，有的會減少。先前的 MJD 相關研究，發現由患病父親傳給子代 CAG 重覆較易增加，使得發病年齡更加提早，而母親傳給子代則不變或減少 (Maruyama et al., 1995)。若同時得到兩個相同的突變基因，此稱為純合子(homozygotes)，其臨床症狀也較嚴重，發病年齡也提早，顯示出可能有基因劑量效應(gene dosage effect) (Kawakami et al., 1995 ; Takiyama et al., 1995)。而性別與發病年齡及症狀的嚴重程度則無相關性 (Kawakami et al., 1995)。

由先前研究報告得知，在人類腦部可偵測出 MJD 基因轉譯出來的蛋白產物(MJD/ataxin-3)，包含多醯胺麩胺酸倍增的突變型 MJD 蛋白，與正常的蛋白 (Trottier et al., 1995)，而這些蛋白一般情況下是位於細胞質的部位。MJD 病人病理切片的研究發現:腦部中的深側基底

核(basal nuclei)、黑質(substantia)、橋腦核(pontine nuclei)、前庭(vestibular)、Clarke 柱索、前角(anterior horn)等處有神經元的喪失及神經膠樣變性之現象。所以腦部應該是 MJD 病症主要所在(Sachdev et al., 1982; Yuasa et al., 1986 ; Takiyama et al., 1994) , 雖然對 MJD 蛋白的正常功能與致病機轉制仍不清楚, 但已知 MJD 基因中倍增的 CAG 重覆序列會誘發細胞的死亡, 且經由表現 MJD 中的多醯胺麩胺酸蛋白質片段於 Purkinje 細胞中的轉殖基因老鼠, 會出現運動失調的症狀(Ikeda et al., 1996);然而小腦的 Purkinje 細胞並不是 MJD 病症所在, 因此欲更進一步研究 MJD 疾病的病理現象, 尚待以更理想的動物模型來進行研究。近年來的研究顯示出 MJD/ataxin-3 蛋白累積於腦部神經細胞核內形成包涵物 (Paulson et al., 1997), 推測可能是經由倍增醯胺麩胺酸的 MJD 蛋白片段促使或催化(catalyzed)其形成, 目前已知道此核內包涵物組成含有全長 MJD 致病蛋白、醯胺麩胺酸倍增片段、正常 MJD 蛋白、泛激素(Ubiquitin)以及一些熱休克蛋白等等, 是否還包括其它蛋白並不清楚。由 CAG 三核 酸重覆序列所造成的疾病中發現, 在 HD (Davies et al., 1997)(Frederic Saudou et al., 1998)、SCA1(Skinner et al., 1997)、SCA3/MJD (Paulson et al., 1997) 及 DRPLA (Igarashi et al., 1998)的轉殖基因老鼠中均發現含多醯胺麩胺酸蛋白質在核內聚集累積形成包涵物, 而且會造成運動神經退化性症狀出現, 另外也有研究學者(Matthew et al., 1998)猜測包涵物會影響神經退化的病程發展, 並推測此疾病病程發展大致可區分兩期:在疾病早期因為致病的 MJD 蛋白干擾蛋白-蛋白之間的交互作用

導致正常神經功能喪失，而疾病晚期會有包涵物出現而此包涵物可能直接或間接造成神經元死亡。但是也有其它學者(Frederic et al., 1998)提出不同看法，在 16 天大的胚胎大老鼠的 Striatum 和海馬迴神經細胞轉殖入 HD 蛋白(huntingtin)並於培養液內添加一些神經滋養因子例如腦部衍生神經滋養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF)以細胞免疫螢光染色發現細胞核內包涵物愈多時則細胞程序性凋亡(apoptosis)的現象會降低;反之，若抑制 ubiquitin 的形成，則見核內包涵物產生會下降，但是細胞程序性凋亡的現象反而加速。因此，核內包涵物究竟是促使神經細胞走向細胞程序性凋亡亦或是保護神經細胞其作用並不清楚，所以目前在文獻上有兩極的說法，再者以目前的參考文獻中大部份是以猴腎臟上皮細胞 (COS 7)(Hanako et al., 1996)，(293T)(Matthew et al., 1998)及鼠類腎臟上皮細胞(GSM14.1)(Bernd et al., 1999) 為實驗模型，並未見到有以人類神經細胞為實驗材料來研究 MJD 的致病機轉，而我們知道 MJD 的主要病灶是在腦部神經細胞，因此我們實驗室希望建立可穩定表達致病 MJD 蛋白的人類神經腫瘤母細胞株(SK-N-SH)作為研究的模型。本論文以細胞免疫染色方法來觀察(1)MJD 蛋白在此株神經細胞內部所表達的現象;(2)經多次繼代培養時，致病 MJD 蛋白的表達現象有無變化;(3)表達致病性 MJD 蛋白的細胞株可存活性是否發生改變。本實驗是將會表達全長致病 MJD 蛋白的質體藉由脂蛋白包裹質體的方式送入人類神經腫瘤母細胞內，由於此質體本身具有 G418 抗藥性基因，所以若此質體 DNA 能嵌入人類神經腫瘤母細胞的染色體 DNA

中，於培養液中添加 G418 藥物則可篩選出可穩定長期表達 MJD 致病蛋白的細胞株。實驗結果篩選出三株可存活含 G418 藥物培養液的人類神經腫瘤母細胞，並運用西方點墨法實驗進一步證明其中一株人類神經腫瘤母細胞可偵測到全長 MJD 致病蛋白產生。而所篩選出可存活含 G418 藥物培養液的人類神經腫瘤母細胞，經 11 代的繼代培養以細胞免疫染色實驗目前尚無發現核內包涵物的形成，而其 MJD 蛋白的分佈主要位於細胞質。

材料與方法

(Material and Method)

一、細胞株及質體的來源

1. 人類神經腫瘤母細胞株(Neuroblastoma cell line;SK-N-SH): 由臺中榮民總醫院教學研究部徐士蘭博士所提供。
2. 表達全長倍增 MJD 基因的質體, pcDNA3-HA-MJD78 ,由 Dr.Mathew Perez 所提供。(表 3)

二、抗體來源

單株抗體:

- (a).MJD mouse 單株抗體由東京醫科大學 Dr.Ichiro Kanazawa 所提供。
- (b).Hemagglutinin epitope(HA) mouse 單株抗體(12CA5)由 Boehringer Mannheim 公司購得。
- (c). β -actin mouse 單株抗體由 Sigma 公司購得。

多株抗體:

- (a). HA rabbit 多株抗體(Y11)由 Santa Cruz Biotechnology 公司購得。
- (b). Ubiquitin rabbit 多株抗體由 DAKO 公司購得。

三、微脂粒法之基因轉殖實驗

將在 25 cm² 培養皿長滿的 SK-N-SH 細胞先以 5 ml phosphate buffer saline(PBS;0.02 g/L KCL , 0.02 g/L KH₂PO₄ , 0.8 g/L NaCl , 0.216 g/L Na₂HPO₄) 緩衝溶液沖洗一下，然後將 PBS 緩衝溶液吸出，再加入 0.5 ml 100%的胰蛋白 (trypsin)(GIBCO BRL,USA) 幫助細胞脫離培養皿，當胰蛋白 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出且要盡量吸乾，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用相位差顯微鏡 (Phase contrast microscope ,Nikon)觀察細胞是否已脫離培養皿，細胞脫落後，加入適當含有血清細胞培養液(血清有抑制胰蛋白作用的效果)，以 10 ml 的無菌玻璃吸管(Sibata,Japan)上下抽吸，待混合均勻後分成 6 個 well(9.6 cm²/well)的圓形培養皿，以 3 個為一組分為兩組：第 一組沒有轉殖(transfection) 任何質體;第 二組當細胞長至 70 %滿時，即可進行轉殖(transfection)。每一個 9.6 cm² 的圓形培養皿將 2 μg pcDNA3-HA-MJD78 質體溶於 100 μl 不含血清且不含抗生素的 DMEM 細胞培養液(其培養液成份為含 1 % L-Glutamine , 1 % MEM Non-Essential Amino Acid Solution 的 Dulbecco`s Modified Eagle Medium) (Gibco BRL)。另外取 8 μl Lipofect AMINE (Gibco BRL) 溶於 100 μl 不含血清不含抗生素的 DMEM 細胞培養液。將上述二溶液以 1 ml 微量分注器上下抽吸混合均勻，靜置室溫 45 分鐘，使其形成 DNA-liposome form。

在此同時每一個 9.6 cm²的圓形培養皿小心加入 2 ml 不含血清不含抗生素的 DMEM 細胞培養液洗滌細胞後再吸掉此培養液。然後每

一個培養皿再加 0.8 ml 不含血清不含抗生素的培養液到此溶液中，混合均勻使總體積為 1 ml。每一個培養皿加入此 1 ml 的培養液並置於 5 %的 37 °C CO₂ 恆溫培養箱內培養 6 小時。

四、加藥物選殖長期表達 MJD 蛋白的神經細胞株

6 小時過後，每一個 9.6 cm²的圓形培養皿再加 1 ml 含有血清的 DMEM 細胞培養液(其培養液成份為含 1 % L-Glutamine , 1 % MEM Non-Essential Amino Acid Solution , 1 % penicillin/streptomycin 及 10 % Fetal bovine serum 的 Dulbecco`s Modified Eagle Medium)。於 24 小時後加入含 G418 Sulfate (0.5 mg/ml; GIBCO BRL) 的細胞培養液。爾後每兩天換一次含 G418 Sulfate 之細胞培養液，兩週後，沒有轉殖之實驗對照組的人類神經腫瘤母細胞全部死亡，此時實驗控制組可見到細胞聚集團(clone)形成。四週後以顯微鏡觀察所有的 clone 並挑選形態較正常的 clone，先以無菌玻璃吸管(Sibata, Japan)吸掉此培養液，再加入 3 ml PBS 緩衝溶液沖洗細胞後並移除 PBS 緩衝溶液，此時可見到不透光的 clone，以無菌棉花棒小心擦拭此 clone 的四週，並且要盡量擦乾。再以 10 µl 的微量分注器吸取 10 µl 的 trypsin 置於此 clone 上並於 5 %的 37 °C CO₂ 恆溫培養箱內培養 1 分鐘，之後吸取含血清的 DMEM 細胞培養液 50 µl 與此 clone 上的 trypsin 溶液以 100 µl 的微量分注器進行上下抽吸。然後將此混合的溶液轉移到 0.5 mm (24 well)的圓形培養皿以 1 ml 含有 G418

Sulfate 的 DMEM 培養液培養。最後將兩個 0.5 mm 圓形培養皿培養長滿的細胞以 2 ml 1 倍的 PBS 緩衝溶液沖洗一下，然後將 1 倍的 PBS 緩衝溶液吸出，再加入 0.2 ml 100%的胰蛋白 (trypsin, GIBCO BRL)，當胰蛋白 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出且要盡量吸乾，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用相位差顯微鏡 (phase contrast, Nikon) 觀察細胞是否已脫離培養皿，待細胞脫落後，加入適當含有血清細胞培養液，以 1 ml 的微量分注器(GILSON) 上下抽吸，待混合均勻後收集於同一個 9.6 cm² 的細胞培養皿中培養。待 9.6 cm² 的細胞培養皿長滿後拆置於兩個 9.6 cm² 的細胞培養皿中，待兩個 9.6 cm² 的細胞培養皿長滿後，收集於同一個 25 cm² 的細胞培養皿中。

五、細胞分盤與細胞代數計算

將長到 8 分滿的細胞由 25 cm² 的細胞培養皿中加入 5 ml PBS 緩衝溶液沖洗一下，然後將 PBS 緩衝溶液吸出，再加入 0.5 ml 1 倍的胰蛋白，當胰蛋白 覆蓋所有細胞後，即馬上吸出且要盡量吸乾，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用相位差顯微鏡觀察細胞是否已脫離培養皿，待細胞脫落後，以含有血清的 DMEM 細胞培養液 8 ml 沖洗細胞，並將以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取 4 ml 分別置於兩個 25 cm² 的細胞培養皿中，故為 1:2 的分盤。此一分盤即計為一個代數。

六、冷凍細胞

當細胞在在 25 cm² 的培養瓶中長滿約 8 分滿時，先以無菌玻璃吸管吸掉此培養液，再加入 3 ml 1 倍的 PBS 緩衝溶液沖洗細胞後並移除 PBS 緩衝溶液，再加入 0.2 ml 100 %的胰蛋白酶，當胰蛋白酶覆蓋所有細胞後，即馬上吸出且要盡量吸乾，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用相位差顯微鏡觀察細胞是否已脫離培養皿，待細胞脫落後，以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取細胞懸浮液轉移到 15 ml 離心管中以 1500 rpm 離心 (HITACHI 05P21, Japan) 10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物並加入 1 ml 冷凍細胞培養液 (60 %DMEM, 30 %FBS, 10 %DMSO)，以 1 ml 的微量分注器上下抽吸，待混合均勻後收集於冷凍管中，將冷凍管移至保麗龍盒中，置於 -80 冰箱，隔天隨即將冷凍管移到液態氮桶中。

七、解凍細胞

首先先取 9 ml 新鮮的細胞培養液，置於 15 ml 離心管中備用。將細胞自液態氮桶中取出(動作要快)，以 1 ml 微量分注器吸取 1 ml DMEM 細胞培養液到冷凍管中並上下抽吸以回融冰狀的細胞培養液，待完全回融後完全轉移到含有 9 ml DMEM 細胞培養液的 15 ml 離心管中以 1500 rpm 離心 (HITACHI 05P21, Japan) 10 分鐘。倒掉上清液留

下細胞沉澱物並加入 4 ml 新鮮的 DMEM 細胞培養液，待混合均勻後，種入 25 cm² DMEM 細胞培養皿中，隔天隨即更換新鮮的 DMEM 細胞培養液。

八、細胞蛋白質的抽取

首先以無菌玻璃吸管吸掉培養液，再加入 3 ml 1 倍的 PBS 緩衝溶液沖洗細胞後並移除 PBS 緩衝溶液，再加入 0.2 ml 100%的胰蛋白酶，手輕輕拍打培養皿邊緣幫助細胞能完全脫離培養皿，利用顯微鏡觀察細胞是否已脫離培養皿，待細胞脫落後，以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取細胞懸浮液轉移到 15 ml 離心管中，以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) 10 分鐘，倒掉上清液留下細胞沉澱物加入 5 ml 1 倍 PBS 至 10 ml 清洗 3 次，以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) 10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物並加入 500 μ l 的細胞蛋白萃取緩衝溶液 (10 倍 PBS , 5 % glycerol , 1 mM sodium EDTA , 1 mM sodium EGTA , 1 mM dithiothreitol (DTT) , 40 μ g/ml leupeptin , 40 μ g/ml aprotinin; , 20 μ g/ml pepstatin , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.5 % Triton X-100) , 混合之後，以超音波震盪器(MISONIX XL2020, USA)以頻率 8 於冰上連續震盪 30 秒之後停留 1 分鐘，重覆 3 次，之後以冷凍離心機 (Beckman AVANTI30, USA)設定溫度在 4 下以 15000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液，將此上清液以 Bio-Rad protein assay 定量方式來定

量蛋白濃度，並將此上清液保存於-20 。

九、蛋白定量分析

以 Bio-Rad 試劑測蛋白濃度 首先以 1:4 之比例混合 Bio-Rad 試劑和水成為 Bio-Rad working reagent，並取待測物 5 μ l 與標準品 (BSA) 5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1 ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後，以分光光度儀(Beckman DU640, USA)於波長 595 nm 測吸光值(OD₅₉₅)，再與標準蛋白(Bovine serum albumin; BSA) 比較以求得待測物之蛋白濃度(μ g/ μ l)。

十、SDS-聚丙烯醯板膠電泳法

取固定全部蛋白總量的細胞萃取液加入蛋白裝載染液(loading dye)，然後在 95 (THERMOLYNE 17600, USA)下作用 5 分鐘。再將反應溶液依序加入膠體凹槽中，將電源供應器(Bio-Rad PAC300)固定在 100 伏特，在 1 倍的電泳緩衝液(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS)下進行膠體電泳分析。而 10% SDS-聚丙烯醯板膠製備如下：

10 % SDS-PAGE

	Resolving gel	Stacking gel
--	---------------	--------------

Acrylamide-bisacrylamide (29:1)	2.5 ml	0.562 ml
1.5 M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml	
0.5 M Tris-HCl pH6.8		1.25 ml
10 % SDS	0.1 ml	0.05 ml
10 % ammonium persulfate	75 μ l	15 μ l
TEMED	15 μ l	4 μ l
d ₂ H ₂ O	5 ml	3.188 ml

十一、西方轉漬法：

將 SDS-聚丙烯醯板膠電泳分析之膠體、nitrocellulose paper (NC paper, Whatman) 及濾紙 (filter paper, ADVANTEC)，以三明治方式夾於 transfer cassette 中，置於 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) 加入 transfer buffer (12 mM Tris pH 8.3, 96 mM Glycine, 20 % Methanol)，以供電器 (Bio-Rad 200/2.0) 固定電流 100 伏特進行 1 小時或 30 伏特過夜。轉漬後的 blot 浸泡於 TTBS buffer (Tris Buffered Saline; 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl) (含 5 % 脫脂牛奶) 進行 blocking，於 4 °C 下置於搖晃器上 (mini-shaker, BOECO) 搖晃過夜，倒出 blocking buffer，加入含有第一次 MJD 單株抗體及 β -actin 單株抗體 (monoclonal Anti-MJD/1:2000 與 β -actin/1:300000) (Wang et al., 1997) 的 TTBS

Buffer (含 0.5 % 脫脂牛奶) 或加入含有第一次 HA 多株抗體及 β -actin 單株抗體 (polyclonal Anti-HA/1:500 與 β -actin/1:300000) 的 TTBS Buffer (含 0.5 % 脫脂牛奶) , 於 4 °C 下搖晃過夜。倒出第一次抗體 , 以 TTBS buffer 洗 5 分鐘 , 重覆三次 , 然後加入含有第二次抗體 Anti-mouse IgG-HRP /1:20000 的 TTBS Buffer (含 1 % 脫脂牛奶) 或加入含有第二次抗體 Anti-mouse IgG-HRP /1:20000 及 Anti-rabbit IgG-HRP/1:20000 的 TTBS Buffer (含 1 % 脫脂牛奶) , 於室溫下搖晃 1 小時。倒出第二次抗體 , 以 TTBS buffer 洗 5 分鐘 , 重覆三次 , 然後加入 1:1 的 Working solution (Luminol/Enhancer solution: stable peroxide solution,Pierce) , 於室溫下搖晃 5-10 分鐘 , 倒掉 Working solution , 將 bolt 置於 X 光片 (Bio-Max,Kodak) 下曝光 , 先曝光一分鐘再依訊號強弱而定曝光時間。

十二、測定存活細胞數：

本實驗是利用 Trypan blue exclusion 方法來檢測細胞存活數目。首先移去細胞培養液 , 以 1 倍 PBS 緩衝溶液先沖洗一次後 , 加入 0.5 ml trypsin , 取 20 μ l 細胞懸浮液加入 5 μ l trypan blue solution 後混合均勻 , 在平光顯微鏡下以紅血球計數器 , 計數血球計數盤上四個 0.1 mm³ 方格之細胞數 , 並以此推算出每 1 ml 培養液中所含的細胞數。

公式：

$$R=N \times 1/4 \times 25/20 \times 10^4 \times Q$$

[R:細胞存活數; N:血球計數器計數四個 0.1mm^3 的方格之細胞總數;
1/4:計數的格數; 25/20:即 $\div 20/25$, 代表微量離心管中細胞所佔的
比例; 10^4 :一格所代表的體積為 10^4 毫升; Q:為細胞培養液的毫升
數]

十三、活細胞影像攝影:

在細胞經不同代數繼代培養後, 利用負像倒立顯微鏡
(OLPMPUS-CK40) 觀察細胞型態 (125X), 再利用照相機
(OLPMPUS-SC35), 將細胞型態影像攝入(柯達 VX200)彩色底片中。

十四、細胞免疫染色

先將 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 的人類神經腫瘤細胞拆到 18×18 mm 的玻片上
培養 2~3 天後, 將玻片置入 9.6 cm^2 培養皿中用 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘
重複 3 次。每個培養皿加 2 ml 4 % paraformaldehyde 固定 20 分鐘,
用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。每個培養皿加 2 ml 3 % H_2O_2 室溫下作
用 15 分鐘, 用 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。每個培養皿加 2ml 含
1 % BSA-0.1 % Tris-100 之 PBS 溶液室溫下作用 25 分鐘, 用 PBS 沖
洗 5 分鐘重複 3 次。

取 200 μl , 1:500 倍 PBS 稀釋之 HA 單株抗體(12CA5, Santa

Cruz Biotechnology) 或 1:500 倍 PBS 稀釋之 MJD 單株抗體或 1:500 倍 PBS 稀釋之 Ubiquitin 多株抗體 (DAKO, USA) 於玻片上再將 parafilm 覆蓋其上 4 作用 16 小時之後用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。取 200 μ l avidin (Bio Genex) 於玻片上再將 parafilm 覆蓋其上於 37 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。取 200 μ l Peroxidase conjugated streptavidin (Bio Genex) 於玻片上再將 parafilm 覆蓋其上於 37 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。取 200 μ l 3,3'-diaminobenzidine chromogen 溶液 (Bio Genex) 於 parafilm 上再將玻片覆蓋其上於室溫下作用 15 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。

每個培養皿加 1ml，4 倍稀釋的 Mayer hematoxylin (MERCK, USA) 染色作用 15 秒鐘、以自來水沖洗 10 分鐘。用 95 %酒精脫水作用 1 分鐘，再用 95 %酒精脫水作用 1 分鐘，最後以 100 %酒精脫水作用 1 分鐘。用擦手紙輕壓拭去水份，待風乾後以封片膠 (Stephens Scientific) 封片。

十五、細胞免疫 DAPI 螢光染色

先將 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 的人類神經腫瘤細胞拆到 18 \times 18 mm 的玻片上培養 2~3 天後，將玻片置入 35 mm 培養皿中用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。每個培養皿加 2 ml 的 4 % paraformaldehyde 室溫下作用 20 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。

取 200 μ l 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 μ g/ml)於玻片上再將 parafilm 覆蓋其上於 37 $^{\circ}$ C 下作用 5 分鐘，用 PBS 沖洗 5 分鐘重複 3 次。以自來水沖洗 10 分鐘。用 95%酒精脫水作用 1 分鐘，再用 95%酒精脫水作用 1 分鐘，最後以 100%酒精脫水作用 1 分鐘。用擦手紙輕壓拭去水份，待風乾後以封片膠(Stephens Scientific) 封片。

十六、死細胞 DNA 抽取

利用 10 ml 無菌玻璃吸管吸取細胞培養兩天後的廢棄液轉移到 15 ml 離心管中以 1500 rpm 離心 (HITACHI 05P21, Japan)10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物並加入 50 μ l 破細胞試劑，以 1 ml 微量分注器上下抽吸將細胞沉澱物打散後，轉移到 1.5 ml 微量離心管，在溫度 55 $^{\circ}$ C 下水浴 10 分鐘，之後以 5000rpm 離心 10 分鐘吸取上清液，保存於 -20 $^{\circ}$ C 。

結果 (Result)

一、 細胞株的選殖

人類神經腫瘤細胞(SK-N-SH)於 ATCC (American Type Culture Collection)中的編號為 HTB-11 其細胞型態類似上皮細胞會黏著於培養皿表面生長,在負像倒立顯微鏡(OLPMPUS-CK40)下所呈現的細胞型態(400X)如圖 1-3 所示。而法國實驗室 Dr.Methrew 所提供的 pcDNA3-HAMJD78 的質體中除了帶有紅血球凝集素(Hemagglutinin epitope;HA) 的基因外還帶有對抗 G418 Sulfate 的基因但在此株細胞本身染色體基因並沒有帶有對抗 G418 Sulfate 的基因因此我們利用這個特點以加入 G418 Sulfate 藥物來選殖是否成功將此質體轉殖並嵌入細胞染色體中。首先我們先將此 SK-N-SH 細胞株分別作 0 mg/ì l、0.1 mg/ì l、0.5 mg/ì l、1 mg/ì l 不同濃度的 G418 藥物測試,結果以 0.5 mg/ì l 處理的 SK-N-SH 細胞株在加藥後第五天細胞大約存活 50%,第十天後細胞死亡約 100%。經參考文獻(Neural cell lines, John N.Wood, 1992)指出一般做細胞藥物選殖時最好的藥物濃度是能在 7~10 天使細胞全部死亡。因此我們選用 0.5 mg/ul 濃度的藥物作為選殖時的藥物濃度。在此藥物濃度下我們從 1:20 的分盤中挑起細胞形態與正常未進行基因轉殖的 SK-N-SH 細胞株較相近的,共有六株,其中三株經 7 代的繼代培養,細胞完全死亡;另外三株則可存活於含 G418 Sulfate 的 DMEM 細胞培養液的神經細胞株,並可培養超過十代。

二、利用單株抗體檢測轉殖細胞內 MJD 蛋白表現

將先前三株可存活於含 G418 的細胞培養液的人類神經腫瘤母細胞株經過培養後抽取細胞中的蛋白質，分別利用 HA 多株抗體(Y11)和 MJD 單株抗體進行西方點墨法分析 MJD 蛋白的表現。(圖 1-1)是以 HA 多株抗體(Y11)所作的西方點墨法分析，lane 1 的蛋白樣本是來自短暫轉殖含有 79 個醯胺麩胺酸重覆序列質體(pCMX79)之 COS7 細胞株，作為對照組，lane 2 是正常的 SK-N-SH 細胞株代表負控制組，lane 3 為所選殖出來編號 B 的細胞株，由圖 1-1 可知道所選殖出來編號 B 的細胞株會表達含有 78 個多醯胺麩胺酸(polyglutamine) MJD 蛋白產物，為了再更一步確定是 MJD 蛋白產物，我們改用另一種 MJD 的單株抗體。

(圖 1-2)是以 MJD 單株抗體以所作的西方點墨法分析，lane 1 是正常的 SK-N-SH 細胞株代表負控制組，lane 2 和 lane 3 為所選殖出來編號 B 的細胞株，由(圖 1-1)和(圖 1-2)可證實編號 B 的細胞株細胞內有 pcDNA3-HAMJD78 質體所表達出的 MJD 蛋白，而且可表達其倍增的 MJD 蛋白和正常的 MJD 蛋白，將此細胞株定名為 SK-N-SH-MJD78。其餘編號 A 及 C 則未見倍增的 MJD 蛋白。(實驗資料未附)

三、正常型和突變型 SK-N-SH 細胞株之細胞形態比較

圖 1-3 為 SK-N-SH 細胞株第三代在負像倒立顯微鏡(OLPMPUS-CK40)下 400 倍下所呈現的細胞型態。

圖 1-4 為 SK-N-SH-MJD78 細胞株第四代在負像倒立顯微鏡(OLPMPUSCK40)400 倍下所呈現的細胞型態。

圖 1-5 為的 SK-N-SH 細胞株第九代在負像倒立顯微鏡(OLPMPUS-CK40)下 400 倍下所呈現的細胞型態。

圖 1-6 為的 SK-N-SH-MJD78 細胞株第十二代在負像倒立顯微鏡(OLPMPUS-CK40)下 400 倍下所呈現的細胞型態。

四、利用多株抗體檢測不同代數轉殖細胞內 MJD 蛋白表現

將已確定具有表達其倍增的 MJD 蛋白和正常的 MJD 蛋白的 SK-N-SH-MJD78 細胞株分別經不同代數繼代培養之後收集其蛋白質萃取物利用 HA 多株抗體(Y11)進行西方點墨法分析 MJD 蛋白的表現。(圖 1-7)是以 HA 多株抗體(Y11)所作的西方點墨法分析，從數位化影像分析系統(AlphaImager 2000)定量分析結果第八代 SK-N-SH-MJD78 細胞株比第六代 SK-N-SH-MJD78 細胞株，其含有 78 個醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物增加 30%。而第十一代 SK-N-SH-MJD78 細胞株比第六代 SK-N-SH-MJD78 細胞株，其含有 78 個醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物增加 20%。似乎有意義，但需要重覆多次實驗以更進一步證明。

五、利用細胞免疫染色觀察 MJD 蛋白表達位置

將 SK-N-SH 細胞和 SK-N-SH-MJD78 細胞分別培養於 18X18 mm 載玻片上之後、進一步以細胞免疫染色觀察 MJD 蛋白表達位置，圖 1-9 為 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 13 代繼代培養以 1:500 倍 PBS 稀釋的 HA 為一次抗體的細胞免疫染色後結果，其中藍紫色部位代表細胞核，棕褐色部份代表 MJD 蛋白。由圖 1-10 中我們可以看到 MJD 蛋白所在位置位於細胞質且似乎有圍繞著細胞核邊緣的現象。而圖 1-8 為正常的神經細胞株(SK-N-SH) 以 1:500 倍 PBS 稀釋的 HA 為一次抗體的染色之結果，其中藍紫色部位代表細胞核，棕褐色部份可能為非特異性的交叉反應(cross-reaction)。圖 1-13 為將此 SK-N-SH-MJD78 細胞株經六代繼代培養後以 1:500 倍 PBS 稀釋的 MJD 單株抗體為第一次抗體的染色之結果發現其細胞核內有異常內容物出現(圖 1-11)箭頭所指示的位置，目前須進一步證明是否為包涵物。圖 1-11 和圖 1-12 為 SK-N-SH 和 SK-N-SH-MJD78 細胞株以 1:1000 倍 PBS 稀釋的 MJD 抗體為第一次抗體的細胞免疫染色後結果，其中藍紫色部位代表細胞核，棕褐色部份代表 MJD 蛋白。由圖 1-11 和圖 1-12 中我們可以看到 MJD 蛋白所在位置皆是擴散分佈於細胞質。圖 1-14 為 SK-N-SH-MJD78 以 1:500 倍 PBS 稀釋的 Ubiquitin 為第一次抗體的染色之結果，其中藍紫色部位代表細胞核，棕褐色部份代表 Ubiquitin 蛋白。由圖中我們可以看到 Ubiquitin 蛋白所在位置位於細胞核和細胞質但核內是否有包涵物並不容易判讀 而圖 1-15 為正常的神經細胞株(SK-N-SH) 以

1:500 倍 PBS 稀釋的 Ubiquitin 為第一次抗體的染色之結果，其中藍紫色部位代表細胞核，棕褐色部份代表 Ubiquitin 蛋白。由圖中我們可以看到 Ubiquitin 蛋白所在位置遍及細胞核和細胞質。

六、利用細胞免疫螢光染色觀察細胞核變化

為了明瞭 SK-N-SH-MJD78 細胞株經多次繼代培養後是否會產生細胞程序性凋亡的現象，我們將此細胞株培養 15 代後以 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)，利用細胞免疫螢光染色觀察細胞核變化。

圖 1-16 為正常 SK-N-SH 細胞株經第八代繼代培養以 DAPI 染色結果，當作實驗對照組。

圖 1-17 為 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 15 代繼代培養後以 DAPI 染色結果，由圖中我們可以觀察到細胞核呈現完整的淡藍色，代表細胞並未出現染色質皺縮及斷裂成片斷之現象。

七、利用 DNA 膠體電泳觀察細胞染色質變化

圖 1-18 中，lane 1 和 lane 2 分別為 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 9 代繼代培養後，收集含死掉細胞的培養廢棄液，經離心後，取其沉澱物並抽取其 DNA，依序取體積 20 μ l 和 10 μ l 加入膠體凹槽內，lane 3 為 100bp 的 DNA 標準指示位置，lane 4 和 lane 5 分別為

SK-N-SH-MJD78 細胞株經 15 代繼代培養後，收集含死掉細胞的培養廢棄液，經離心後，取其沉澱物並抽取其 DNA，依序取體積 20 μ l 和 10 μ l 加入膠體凹槽內。結果並沒有明顯出現細胞程序性死亡進行細胞凋亡會產生所謂 DNA 階段化(DNA ladder)特別的型態特徵。

討論 (Discussion)

在本論文 HA 抗體和 MJD 抗體的西方墨點法實驗結果中我們可以發現當使用 MJD 抗體時在 60 kDa 附近有兩條 band, 由 MJD cDNA clone 含有二十六個醯胺麩胺酸重覆序列推算, 其蛋白預測分子量約 42 kDa, 而依此推算, 七十八個醯胺麩胺酸重覆序列, 其蛋白預測分子量約 47 kDa, 而從 SCA3/MJD 病人的蛋白分析一般正常(26 個醯胺麩胺酸重覆序列)和倍增(71 個醯胺麩胺酸重覆序列)的 MJD 蛋白分別約在 50 kDa 和 60 kDa(同圖 1-1 和圖 1-2), 比所估計的分子量高, 而且不同的細胞形態其 MJD 蛋白的分子量會有所差異(Paulson et al., 1997)。我們知道在真核生物細胞中, 許多蛋白質經核糖體轉譯出來後, 會藉由在特定的胺基酸上進行轉譯後的修飾作用(posttranslational modification)來調控蛋白的活性, 如甲基化(methylation)、醣化(glycosylation)、磷酸化(phosphorylation)、雙硫鍵的形成(disulfide bond formation)等(Beyer et al., 1997; Soulard et al., 1993; Wilk et al., 1985)。因此猜測有可能經過這些修飾後而使得 MJD 蛋白分子量增加, 而這種轉譯後的修飾作用又可能因不同細胞而有所差異。另一方面 60 kDa 附近可見兩條 band 的原因有可能是因為 MJD 單株抗體所辨認 MJD 的位置靠近 MJD 蛋白 C 端的位置(Guanghui et al., 1997), 而 HA 多株抗體所辨認 MJD 的位置是在 MJD 蛋白 N 端 HA-tag 的位置, 因此若有部份 MJD 蛋白的水解產物形成而且此水解位置若位於 MJD 蛋白 C 端的位置, 則可能引起如圖 1-2 的結果, 另一可能則是 MJD 蛋白本身轉錄後修飾而成為不同的異構物, Thorsten 等人於 1998 指出 MJD1 基因會

有三種不同的 MJD 異構物，主要是在於 C 端的氨基酸序列有所不同分別是基因多形性及選擇性轉錄後剪接所造成的。此外，我們也無法排除此現象為非特異性交叉反應，因為從文獻資料中 (Henry et al., 1997) (Matthew et al., 1998) 可發現此 HA 抗體會因不同種類細胞而有不同的非特異性交叉反應。

早先其他的研究顯示在細胞免疫染色實驗裏若單獨短暫表達全長 MJD 致病蛋白時，此蛋白不會出現於細胞核內部除非是具有 NLS(nuclear localization signal) 區域的全長 MJD 致病蛋白才會進入細胞核內形成細胞核內包涵物 (neuronal intranuclear inclusions/NIIs)。然而根據 Schmidt 等人在 1999 年以人類神經腫瘤細胞 (SK-N-AS) 和 Paulson 等人在 1998 年以經短暫性倍增的 MJD 基因轉殖後老鼠神經細胞 (MN-1) 作細胞免疫螢光染色，分別顯示正常的 MJD 蛋白和倍增的 MJD 蛋白這兩個蛋白是主要是擴散性分佈於神經細胞的細胞質，包括軸突和樹突，而在細胞核內無法觀察到 MJD 蛋白的分佈，與本論文中只表達正常 MJD 蛋白的人類神經腫瘤細胞和可表達正常 MJD 蛋白和倍增 MJD 蛋白的 SK-N-SH-HAMJD78 細胞株所作的細胞免疫染色 (圖 1-9) 是相符合的，但是法國學者 Bernd 等人 1999 年以猴類腎臟上皮細胞株 (CSM14.1) 為實驗模型，卻觀察到的全長 MJD 致病蛋白可在此株細胞內形成核內包涵物，或許是因為細胞形態不同而對 MJD 蛋白有不同影響，也有可能是因為 Bernd 等人利用的是 MJD 單株抗體 (1H9)，而此株抗體所辨認的是在 MJD 蛋白的 C 端，而我們用的 HA 抗體是位於 MJD 蛋白 N 端前面的 HA-tag，有可能全長 MJD 蛋

白在被運送進入細胞核內前 N 端已被水解,只有 C 端的尾端能進入細胞核,因此而可能無法偵測到核內包涵物。

另外從細胞免疫染色的結果可以看出 MJD 蛋白似乎偏好位於人類神經腫瘤細胞的細胞核週圍,是否意謂著 MJD 蛋白在神經細胞內有更大的機率隨時可跟某些具有含多個醯胺麩胺酸重覆序列的蛋白,藉由蛋白-蛋白之間的交互作用而進入細胞核。而多醯胺麩胺酸蛋白片段的增加,容易成為醯胺麩胺酸轉移 催化 (transglutaminase-catalysed)的受質,與腦部未知而特異性表達的蛋白質以共價鍵結的方式形成不可溶的集合體 (Kahlem et al., 1996; Igarashi et al., 1998)。當鈣離子出現,活化了醯胺麩胺酸轉移 時,多醯胺麩胺酸蛋白便可成為胺基(amine)接受體,而形成交叉結合 (Kahlem et al., 1996)。當含有截斷的(truncated)的 DRPLA 蛋白的猴類腎臟細胞(COS-7)中加入醯胺麩胺酸轉移 的抑制物,能夠降低細胞中包涵物的產生及降低細胞的死亡 (Igarashi et al., 1998)。由此現象說明含有多醯胺麩胺酸蛋白質容易與其他蛋白質鍵結的可能性,同時多醯胺麩胺酸蛋白質的包涵物在神經細胞核內沉澱,顯示造成神經退化性疾病的病程發展的主要部位是位於神經細胞。而當多醯胺麩胺酸蛋白片段增加時,也可能會經由氫鍵的鍵結而形成 β -sheets,而造成 polar zipper 結構,導致 homodimerization 或是非專一性的鍵結到其他調節蛋白 (Perutz, M. 1994)例如人類的 TATA binding protein(TBP)轉錄因子而可能降低其它重要蛋白的生成進而造成神經細胞喪失功能(Matthew et al., 1999)。

近來研究發現，CAG 三核 酸重覆序列倍增突變所引起的疾病中，包括 HD (DiFiglia et al., 1997; Davies et al., 1998)、SCA1 (Gilman et al., 1996)、SCA3/MJD (Paulson et al., 1997)與 SCA7 (Holmberg, et al., 1998) , DRPLA (Igarashi et al., 1998)在神經病理切片普遍發現神經細胞核內有包涵物的存在，而包涵物是多醯胺麩胺酸蛋白片段所聚集，包涵物因而影響或阻斷核內正常的蛋白作用 (Paulson et al., 1997) , 可能會影響或加速病程發展，目前認為 MJD 致病機轉的假設(表 2)是認為倍增的醯胺麩胺酸 MJD 蛋白被 Caspase 或 Ub-proteasome 水解成具有毒性的片段並且由於構形改變故對蛋白分解 具有抗性(Paul et al., 2000) , 再藉由其它蛋白或直接進細胞核內，而這種毒性只在細胞核內才會發生並造成細胞死亡。由本論文的 SK-N-SH-MJD78 細胞免疫染色實驗可得知細胞內尚未觀察到明顯的核內包涵物產生，或許有但是很小或是易被泛激素依賴性蛋白水解途徑(Ubiquitin-dependent proteasome pathway)清除。因此我們想要觀察表達致病 MJD 蛋白細胞死亡的現象，我們知道細胞死亡的方式有兩種：一種稱為細胞壞死；另一種稱為細胞程序性死亡(Apoptosis)。經由細胞壞死方式，細胞會先腫脹 (Swelling) 。細胞死亡後會破碎成小碎片(Debris) , 細胞內的溶解性酵素會被釋出，一些有毒物質亦隨之被釋放出來，常引起發炎反應，而造成附近的細胞或組織傷害 (Wyllie et al., 1980) ; 而細胞凋亡則不會導致上述反應。細胞程序性死亡進行細胞凋亡時最特別的型態特徵是胞核染色質的凝集，染色質會發生濃縮聚集的情形 (Kerr et al., 1972) , 並

呈新月狀靠在核膜邊 (Wyllie et al., 1980), 然後細胞變小皺縮 (Shrinkage), 細胞膜有發泡現象, 染色體受內核酸水解 (endonuclease) 作用而斷裂, 從細胞膜分離出的小泡, 內含片段的染色體, 而形成凋亡小體 (Apoptotic bodies)。

但是從 SK-N-SH-HAMJD78 細胞進行 DAPI 螢光染色實驗結果和其死亡細胞 DNA 膠體電泳分析實驗結果並沒有發現染色質皺縮及斷裂成片段之現象。雖然 SK-N-SH-MJD78 細胞模型的細胞核內並未可觀察到核內包涵物產生, 繼代培養也尚未觀察到細胞的進行細胞程序性凋亡, 此細胞模型將可作為未來實驗的重要材料, 將可進一步想辦法去誘導此 SK-N-SH-MJD78 細胞株產生包涵物, 根據 Frederic 等人於 1998 指出 protease/caspase CPP32 的拮抗劑 N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Al (Ac-DEVD-CHO) 和一些神經滋養因子可誘導含多醯胺麩胺酸疾病蛋白的包涵物增加而降低細胞死亡, 另外我們也將利用這株細胞株給予一些外在環境因子的壓力, 例如、紫外線照射和過氧化物等促進老化的藥劑處理, 觀察此細胞株在老化過程中 MJD 蛋白表達是否隨著細胞老化或代數增加? 或 MJD 蛋白表達是否有明顯的位置改變? 甚至可觀察核內包涵物產生的過程以及是否會誘導核內包涵物增加? 是否會誘導細胞程序性凋亡? 希望藉此釐清核內包涵物產生的機制和細胞程序性凋亡之間的研究。

62KD—

←Mutant MJD

* nonspecific

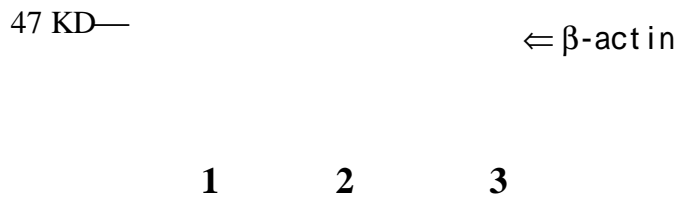


圖 1-1 HA 多株抗體檢測轉殖細胞內 MJD 蛋白表現。

lane 1 的蛋白樣本是來自短暫轉殖含有 79 個醯胺麩胺酸重覆序列質體(pCMX79)之 COS7 細胞株，lane 2 是正常的 SK-N-SH 細胞株代表負控制組，lane 3 為所選殖出來編號 B 的細胞株，實心箭頭代表含有 78 個多醯胺麩胺酸(polyglutamine) MJD 蛋白產物，箭頭代表 β-actin 蛋白產物，星號代表非特異性交叉反應。



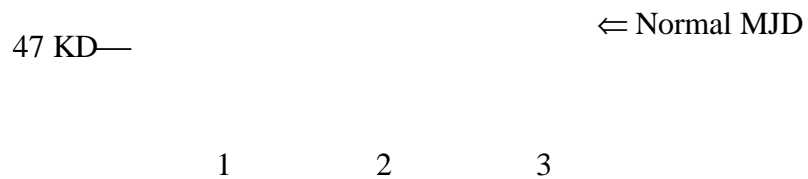


圖 1-2 MJD 單株抗體檢測轉殖細胞內 MJD 蛋白表現。

lane 1 是正常的 SK-N-SH 細胞株代表負控制組，lane 2 和 lane 3 為所選殖出來編號 B 的細胞株，實心箭頭代表含有 78 個醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物，空心箭頭代表 26 個醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物。星號可能為非特異性反應或 MJD 蛋白水解產物。

細胞培養後，經由顯微鏡 200X 放大觀察之細胞型態。

圖 1-3 SK-N-SH 細胞株經 3 代繼代培養後之細胞型態。

圖 1-4 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 4 代繼代培養後之細胞型態。

細胞培養後，經由顯微鏡 200X 放大觀察之細胞型態。

圖 1-5 SK-N-SH 細胞株經 9 代繼代培養後之細胞型態。

圖 1-6 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 12 代繼代培養後之細胞型態。

62 KD—

47 KD—

← Mutant MJD

* nonspecific

⇐ β -actin

1 2 3 4 5

圖 1-7 利用 HA 多株抗體檢測不同代數轉殖細胞內 MJD 蛋白表現

lane 1 是短暫轉殖含有 79 個醯胺麩胺酸質體(pCMX-HAMJD79)之 COS7 細胞株，lane 2 是正常的 SK-N-SH 細胞株代表負控制組，lane 3 是第六代 SK-N-SH-MJD78 細胞株，lane 4 是第八代 SK-N-SH-MJD78 細胞株，lane 5 是第十一代 SK-N-SH-MJD78 細胞株。實心箭頭代表含有 78 個醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物，空心箭頭代表 β -actin 蛋白產物，箭號代表非特異性交叉反應。

以 HA 單株抗體進行細胞免疫染色結果

圖 1-8 SK-N-SH 細胞株經 8 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。

藍紫色為細胞核被蘇木紫(hematoxylin)所染色。棕褐色為非特異性反應。

(1000X)

圖 1-9 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 13 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。

藍紫色為細胞核被蘇木紫(hematoxylin)所染色。棕褐色為 MJD 蛋白，由圖中可

看到 MJD 蛋白分散於細胞質。(400X)

圖 1-10 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 13 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。
藍紫色為細胞核被蘇木紫(hematoxylin)所染色。棕褐色為 MJD 蛋白，由圖中可
看到 MJD 蛋白位在比較靠近細胞核週圍(如箭頭所標示)(1200X)。

以 MJD 單株抗體進行細胞免疫染色結果

圖 1-11 SK-N-SH 細胞株經 8 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。

藍紫色為細胞核被蘇木紫(hematoxylin)所染色。棕褐色為 MJD 蛋白，由圖中可看到 MJD 蛋白分散於細胞質。(1000X)

圖 1-12 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 13 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。

藍紫色為細胞核被蘇木紫(hematoxylin)所染色。棕褐色為 MJD 蛋白，由圖中可看到 MJD 蛋白分散於細胞質。(1000X)。

圖 1-13 為 SK-N-SH-MJD78 細胞株經六代繼代培養後以 1:500 倍 PBS 稀釋的 MJD 單株抗體為第一次抗體的染色之結果發現其細胞核內有異常內容物出現(圖 1-11)箭頭所指示的位置，

以 Ubiquitine 多株抗體進行細胞免疫染色結果

圖 1-14 SK-N-SH 細胞株經 8 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。
藍紫色為細胞核被蘇木紫 (hematoxylin) 所染色。棕褐色為 Ubiquitine 蛋白，由圖中可看到 Ubiquitine 蛋白分散於細胞質和細胞核。(1200X)

圖 1-15 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 13 代繼代培養後，進行細胞免疫染色之結果。
藍紫色為細胞核被蘇木紫 (hematoxylin) 所染色。藍紫色為細胞核被蘇木紫 (hematoxylin) 所染色。棕褐色為 Ubiquitine 蛋白，由圖中可看到 Ubiquitine 蛋白分散於細胞質和細胞核。(1200X)
以 DAPI 染細胞核觀察細胞核完整性。

圖 1-16 SK-N-SH 細胞株經 8 代繼代培養後，進行 DAPI 染色之結果。

藍色螢光為細胞核。並未出現斷裂之現象。(400X)

圖 1-17 SK-N-SH-MJD78 細胞株經 15 代繼代培養後，進行 DAPI 染色之結果。

藍色螢光為細胞核。並未出現斷裂之現象。(400X)

1 2 3 4 5

圖 1 - 18 抽取細胞 DNA 進行洋菜膠電泳分析。

SK-N-SH-MJD78 細胞株經 9 代和 15 代繼代培養後，抽取細胞 DNA，以 3%洋菜膠進行電泳分析。

第二章

Lamotrigine 藥物對 MJD 致病蛋白之分生研究

Molecular Studies of the Mutant ataxin-3
under the Treatment of Lamotrigine

中文摘要

Machado-Joseph 疾病是晚發性的體染色體顯性遺傳疾病，
一種小腦脊髓漸進性神經退化性疾病，此疾病的徵狀在臨床上變

化很多，顯現範圍很廣，主要病徵有：運動失調、漸進性眼外肌麻痺、錐體及外錐體路徑的病徵、肌張力的異常及僵硬末稍肌萎縮、臉部及舌的顫搐。MJD 的基因位於在第 14 對染色體長臂上，在靠近 3'端轉譯區(translated region)內，有一段不穩定的 CAG 核酸重覆序列倍增突變。有關 MJD 疾病的治療至目前為止仍根據臨床徵狀來治療。Lamotrigine 是一種新的抗癲癇藥物，被廣泛用來治療單純性或複合性的痙攣。根據臨床的觀察發現 Lamotrigine 能夠減輕 MJD 臨床的症狀，先前研究顯示含致病 MJD 蛋白的淋巴母細胞處理 lamotrigine 2 天後發現 lamotrigine 的濃度增加到 300 μM 時，會降低致病 MJD 蛋白至多 30% 的表現，顯示 lamotrigine 對淋巴母細胞中所表現的致病 MJD 蛋白的具有抑制性。

本論文延續先前的研究利用已建立的人類神經母細胞株 (SK-N-SH-MJD78)，其中可表達正常 MJD 蛋白及致病 MJD 蛋白，此細胞培養後以不同濃度的 lamotrigine 處理 2 天之後，再以西方轉漬法分析致病 MJD 蛋白表現。發現 lamotrigine 的濃度增加到 200 μM 時，會降低致病 MJD 蛋白的表現，顯示 lamotrigine 在人類神經母細胞株中對致病 MJD 蛋白的表現也具有抑制性。這個結果與先前淋巴母細胞實驗及臨床觀察的現象相似。

另一方面，病人於服用 lamotrigine 藥物前後，以西方轉漬法分析突變 MJD 蛋白表現，發現有的病人服藥後，其突變 MJD 蛋白的表現增加，而有的病人服藥後，其突變 MJD 蛋白的表現有

減少的現象，這種血液中 MJD 蛋白表達的不穩定性可能與病人個體於抽血時的生理情況有相互關係。因此，需進一步的研究以釐清此藥物作用於人體 MJD 蛋白的機制。

英文摘要

(Abstract)

Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant spinocerebellar degeneration characterized by a wide range

of clinical manifestations, including ataxia, progressive external ophthalmoplegia, pyramidal and extrapyramidal signs, dystonia with rigidity, and distal muscular atrophies. Unstable CAG trinucleotide repeat expansion in MJD gene on long arm of chromosome 14 has been identified as the pathologic mutation of MJD.

The treatment of MJD has so far been purely symptomatic. Lamotrigine, an antiepileptic drug, was found to specifically relieve some major symptoms of MJD patients. Previous results from our laboratory showed that lymphoblastoid cell from MJD patients expressed 30 % less mutant ataxin-3 under 300 μ M LTG treatment for two days. Encouraged by the clinical observation and the results from LCLs, we carried out the expression analysis of ataxin-3 in cultured SK-N-SH-MJD78 cells under the treatment of different concentrations of LTG. Western blot analysis demonstrated that extracellular application of 200 μ M LTG decreased the expression of mutant ataxin-3 in cultured cells. This observation is consistent with the previous observations.

Further analysis will be performed for better

understanding of the role(s) which lamotrigine may play
in the pathogenesis of MJD.

序論

(Introduction)

而 MJD 根據其發病年齡、發病的部位、及運動神經元退化的情形，可分為：

第一型：早發型(earlier onset):此型的臨床症狀顯現的較早且嚴重，發病的年齡約在 20-30 歲(平均約在 24.3 歲)，較顯著的病徵為錐體及外錐體徑路的症狀。

第二型：中間型(middle onset)：大都發生於中年人，發病的年齡約在 40.5 歲，主要的病症有小腦運動失調及眼肌麻痺。

第三型：晚發型(later onset)：發病的年齡約在 40-60 歲(平均約在 46.8 歲)，主要的症狀有末梢肌萎縮、小腦運動失調及眼肌麻痺。

大部份的患者都屬於第二型，但也有例外，從 5 歲到 73 歲都有發病者的報告(Sequeiros and Coutinho 1993)，所以 MJD 發病的年齡分佈非常的廣，而且臨床上所表現的病徵複雜。尤其是第三型晚發型的 MJD，大都在成年後才發病，對家庭與社會都是一大負擔。我們實驗室近年來針對此疾病在台灣地區分佈的情形和臨床病徵作過研究，目前已檢驗出二十四個 MJD 家族患病人數達百人以上，本實驗室以聚合-連鎖反應方法分析發現到的 MJD 基因其 CAG 核酸重複序列(repeats)的正常值為 13-44

repeats , 異常的範圍為 72-85 repeats(Hsieh et al.,1997)。而根據日本的研究統計結果發現：小腦脊髓退化的發生率 (prevalence) 為 4.53/100,000 , 而其中 2 % 為 MJD(Hirayama et al., 1994) 。而許多 CAG 三核 酸重覆序列倍增突變所引起的疾病 , 如亨汀頓氏舞蹈症(Huntington's Disease ; HD)、小腦脊髓運動失調症第一型(SCA1)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症(DRPLA) 等 , 目前對於含倍增多醯胺麩胺酸蛋白產物的功能不清楚 , 但是在 SCA1 的轉殖基因老鼠身上發現會產生小腦運動失調以及小腦中的浦金埃(Purkinje)細胞有退化的情形 (Burrigh et al., 1995); 帶有 CAG 倍增 ataxin-3 基因的轉殖基因老鼠 (Ikeda et al., 1996)與 HD 的轉殖基因老鼠中 (Mangiarin et al., 1996) , 亦表現出運動失調與神經退化的情形。在 1997 年發現在 HD 的 CAG 倍增轉殖基因老鼠中發現 , 在老鼠的腦部神經細胞核內有包涵物 (neuronal intranuclear inclusions/NIIs) 的出現 (Davies et al., 1997)。近來研究發現 , CAG 三核 酸重覆序列倍增突變所引起的疾病中 , 包括 HD (DiFiglia et al., 1997; Davies et al., 1998)、SCA1 (Gilman et al., 1996)、SCA3/MJD (Paulson et al., 1997)與 SCA7 (Holmberg, et al., 1998) , DRPLA (Igarashi et al., 1998) 在神經病理切片普遍發現神經細胞核內有包涵物的存在 , 包涵物是多醯胺麩胺酸片段蛋白所引發產生聚集 , 包涵物因而影響或阻斷核內正常的蛋白作用 (Paulson et al., 1997) , 可能會引發神經細胞死亡或加速病程發展。

有關 MJD 疾病的治療至目前為止仍根據臨床病狀來治療，尚無有效的治療藥物，以前 Sakai 等人於 1995 曾指出以 Sulphame-thoxazole 和 Trimethoprim (Bactrim) 治療 MJD 疾病所造成的步態不穩和運動不協調，但並無研究說明藥物對疾病的治療機制。而 Lamotrigine [3,5-diamino-6-(2,3 dichlorophenyl)-1,2,4-triazine; LTG] 是一種 phenyl-triazine 化合物，是一種新的抗癲癇藥物，被廣泛用來治療單純性或複合性的痙攣。先前實驗研究顯示 MJD 病人的淋巴母細胞株受到 300 μ M LTG 藥物作用 2 天後，根據西方轉漬法分析結果顯示致病的 MJD 蛋白至多約有 30% 的產量下降 (許秀美碩士論文, 1998)，此一結果或許可以解釋臨床的觀察發現 Lamotrigine 能夠減輕 MJD 臨床的症狀。因此為了更進一步了解此藥物對 MJD 蛋白表達影響的分生機制，我們實驗室利用先前已選殖出來會長期表達 MJD 致病蛋白的細胞株 (SK-N-SH-MJD78) 予以培養且抽取其細胞蛋白進一步分析此藥物對於致病 MJD 蛋白之影響；另一方面與光田醫院神經內科劉青山醫師共同合作，從已確定是 MJD 的病人分別抽取未服用藥物前和服用藥物後的週邊血液運用分生實驗方法 (西方轉漬法/Western blot) 分析其 MJD 蛋白變化來探討 Lamotrigine 此藥物和 MJD 蛋白的相互關係。

材料與方法

(Material and Method)

一、 檢體的來源:

- 1.血液: 台中光田醫院神經內科劉青山醫師所提供, 診斷為 MJD 疾病患者分別於服用藥物前後抽取的血液。

二、 細胞株與質體來源:

- 1.淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL): 由中山醫院神經內科呂聰明醫師所提供 MJD 疾病患者抽取的血液, 然後由中山醫學院細胞遺傳室李宣佑教授將之建立成淋巴母細胞株。(表 4)(楊千螢碩士論文, 1997)

- 2.表達全長倍增 Machado-Joseph Disease 蛋白人類神經腫瘤母細胞株(Neuroblastoma cell line;SK-N-SH): 由臺中榮民總醫院神經內科徐士蘭博士所提供、然後由本實驗室將之建立成表達全長倍增 MJD 蛋白神經母細胞株, 定名為 SK-N-SH-MJD78。

(圖 1-1)

- 3.表達全長倍增 MJD 基因的質體, pcDNA3-HA-MJD78, 由

Dr.Mathew Perez 所提供。(表 3)

二、 抗體來源

1.單株抗體:

(a).MJD mouse 單株抗體由東京醫科大學 Dr.Ichiro Kanazawa 所提供。

(b).HA mouse 單株抗體(12CA5)由 Boehringer Mannheim 公司購得。

(c). β -actin mouse 單株抗體由 Sigma 公司購得。

2.多株抗體:

HA rabbit 多株抗體(Y11)由 Santa Cruz Biotechnology 公司購得。

三.週邊血液蛋白質的抽取:

將 5 ml 的新鮮血液加入等量的 PBS , 混合均勻後的液體緩緩加入於 5 ml 的 Ficol-Paque(Pharmacia Biotech)上 , 以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) , 30 分鐘 小心取出 Buffy coat 層轉移到 15 ml 離心管 , 加入 1 倍 PBS 至 10 ml 清洗 3 次 , 以 1500 rpm 離心 , 10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物並加入 500 μ l 的的細胞蛋白萃取緩衝溶液 (10 倍 PBS , 5 % glycerol , 1 mM sodium EDTA , 1 mM sodium EGTA , 1 mM dithiothreitol (DTT) , 40 μ g/ml leupeptin , 40 μ g/ml aprotinin , 20 μ g/ml

pepstatin , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.5 % Triton X-100) , 混合之後 , 以超音波震盪器 (MISONIX XL2020,USA)以頻率 8 於冰上連續震盪 30 秒之後停留 1 分鐘 , 重覆 3 次 , 之後以冷凍離心機(Beckman AVANTI30,USA)設定溫度在 4 下以 15000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液 , 將此上清液以 Bio-Rad protein assay 定量方式來定量蛋白濃度 , 並將此上清液保存於-20 。

四.細胞培養:

將對照組的神經細胞株 (SK-N-SH;neuroblastoma cell) 及長期表達之穩定神經細胞株 (SK-N-SH-MJD78)培養在 25cm² 的培養皿 , 所用的培養液為 90 % DMEM , 10 % FBS , 1% NEAA , 1 % PSN , 1 % L-glutamine 及 0.5 mg/ml G418 Sulfate(GIBCO BRL)。爾後每兩天換一次細胞培養液 , 將培養皿置於 37 , 5 % 二氧化碳培養箱。

五.細胞加藥物處理

將長到八分滿細胞由 25cm² 的細胞培養皿中加入 3 ml 1 倍的 PBS 緩衝溶液沖洗一下 , 然後將 1 倍的 PBS 緩衝溶液吸出 , 再加入 0.5 ml 1 倍的胰蛋白 , 當胰蛋白 覆蓋所有細胞

後，置於 37°C 培養箱 1 分鐘，使細胞脫離培養皿，待細胞脫落後，以含有血清的 DMEM 細胞培養液 8ml 沖洗細胞，並將細胞吸出，分別置於有 6 個 well (9.6 cm²/well) 的細胞培養皿中。待細胞長滿至七分滿時分別加 DMSO 和不同濃度的 LTG (溶於 DMSO)：分別是 0 μM、50 μM、100 μM、200 μM、300 μM 共六組。待 48 小時後抽取細胞蛋白質。

六. 細胞蛋白質的抽取：

首先將培養皿中的培養液吸出，加入 5 ml 1 倍 PBS 緩衝液至 10 ml 清洗 3 次再用刮杓將細胞刮下，用 10 ml 無菌玻璃吸管將緩衝液連同細胞一起吸到 15 ml 尖底離心管，以 1500 rpm 離心 (HITACHI 05P21, Japan) 10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物並加入 500 μl 的細胞蛋白萃取緩衝溶液 (10 倍 PBS, 5 % glycerol, 1 mM sodium EDTA, 1 mM sodium EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 40 μg/ml leupeptin, 40 μg/ml aprotinin; , 20 μg/ml pepstatin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 % Triton X-100)，混合之後，以超音波震盪器 (MISONIX XL2020, USA) 以頻率 8 於冰上連續震盪 30 秒之後停留 1 分鐘，重覆 3 次，之後以冷凍離心機 (Beckman AVANTI30, USA) 設定溫度在 4 °C 下以 15000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液，將此上清液以 Bio-Rad

protein assay 定量方式來定量蛋白濃度，並將此上清液保存於-20。

七. 蛋白定量分析

以 Bio-Rad 試劑測蛋白濃度。首先以 1:4 之比例混合 Bio-Rad 試劑和水成為 Bio-Rad working reagent，並取待測物 5 μ l 與標準品(BSA)5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1 ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後，以分光光度儀 (Beckman DU640, USA)於波長 595 nm 測吸光值(OD₅₉₅)，再與標準蛋白(Bovine serum albumin; BSA)比較以求得待測物之蛋白濃度(μ g/ μ l)。

八、SDS-聚丙烯醯板膠電泳法:

取固定全部蛋白總量的細胞萃取液加入蛋白裝載染液 (loading dye; β -mercaptoethanol, 10 %SDS, tracking dye)，然後在 95 (THERMOLYNE 17600, USA)下作用 5 分鐘。再將反應溶液依序加入膠體凹槽中，將電源供應器(Bio-Rad PAC300)固定在 100 伏特，在 1 倍的電泳緩衝液(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS)下進行膠體電泳分析，首先以 90 伏特電壓進行電泳分離，直到染劑到下層解析凝膠(resolving gel)時，再改以 100 伏特電壓進行電泳

分離。而 10 %SDS-聚丙烯醯板膠製備如下：

10 % SDS-PAGE

	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide-bisacrylamide (29:1)	2.5 ml	0.562 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml	
0.5M Tris-HCl pH6.8		1.25 ml
10 % SDS	0.1 ml	0.05 ml
10 % ammonium persulfate	75 μ l	15 μ l
TEMED	15 μ l	4 μ l
D ₂ H ₂ O	5 ml	3.188 ml

九. 西方轉漬法：

將 SDS-聚丙烯醯板膠電泳分析之膠體、硝化纖維紙 (nitrocellulose paper; NC paper, Whatman) 及濾紙 (filter paper, ADVANTEC), 以三明治方式夾於 transfer cassette 中, 置於 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) 加入轉印緩衝溶液(transfer

buffer; 12 mM Tris pH 8.3, 96 mM Glycine, 20 % Methanol) ,以供電器(Bio-Rad 200/2.0)固定電流 100 伏特進行 1 小時或 30 伏特過夜。轉漬後的 blot 浸泡於 TTBS 緩衝溶液 (Tris Buffered Saline; 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl,Tween 20)(含 5 % 脫脂牛奶)進行 blocking , 於 4 °C 下置於搖晃器上(mini-shaker, BOECO)搖晃過夜 , 倒出 blocking buffer , 加入含有第一次 MJD 單株抗體及 β -actin 單株抗體 (monoclonal Anti-MJD/1:2000 與 β -actin/1:300000)(Wang et al., 1997)的 TTBS 緩衝溶液 (含 0.5 % 脫脂牛奶) 或加入含有第一次 HA 多株抗體及 β -actin 單株抗體 (polyclonal Anti-HA/1:500 與 β -actin/1:300000)的 TTBS Buffer (含 0.5 % 脫脂牛奶) , 於 4 °C 下搖晃過夜。倒出第一次抗體,以 TTBS buffer 洗 5 分鐘,重覆三次,然後加入含有第二次抗體 Anti-mouse IgG-HRP /1:20000 的 TTBS 緩衝溶液 (含 1 % 脫脂牛奶)或加入含有第二次抗體 Anti-mouse IgG-HRP /1:20000 及 Anti-rabbit IgG-HRP/1:20000 的 TTBS 緩衝溶液(含 1 % 脫脂牛奶) , 於室溫下搖晃 1 小時。倒出第二次抗體,以 TTBS 緩衝溶液洗 5 分鐘,重覆三次 , 然後加入 1:1 的 Working solution (Luminol/Enhancer solution: stable peroxide solution,Pierce) , 於室溫下搖晃 5-10 分鐘 , 倒掉 Working solution , 將 bolt 置於 X 光片(Bio-Max, Kodak) 下曝光 , 先曝光一分鐘再依訊號強弱而定曝光時間。

結果

(Results)

一、 抗癲癇藥物處理人類神經腫瘤母細胞

由臨床資料知道(劉青山,個人資訊,表 5 和表 6), 抗癲癇藥物 lamotrigine(LTG)能夠改善 MJD 患者的臨床主要症狀, 包括運動失調的症狀有進步, 眼肌移動速度漸漸增加, 小腿肌肉張力增加, 而其他的抗癲癇藥物則無法有效改善 MJD 患者的症狀, 因此我們為了探討 lamotrigine 藥物對 MJD 疾病的影響, 所以在人類神經腫瘤母細胞(SK-N-SH-MJD78)培養過程中, 分別使用溶於 DMSO 中的 lamotrigine (LTG)與 dilantin (Phenytoin) 兩種抗癲癇藥物來處理細胞。細胞培養液中 DMSO 濃度是 1 μ l/ml, 當細胞中只有 DMSO 時, 經過 48 小時的處理並不會影響細胞的存活率(實驗資料未附)。分別處理 50 μ M、 100 μ M、 200 μ M、 300 μ M 濃度的 lamotrigine (LTG), 經過 48 小時 lamotrigine (LTG) 處理後, 以西方轉漬法分析, 結果顯示於(圖 2-1), 其中 lane 1 是 50 μ M 濃度 lamotrigine 處理的檢體, lane 2 是以 100 μ M 濃度 lamotrigine 處理的檢體, lane 3 是以 200 μ M 濃度 lamotrigine 處理的檢體, lane 4 是以 300 μ M 濃度 lamotrigine 處理的檢體, lane 5 是以 DMSO 處理的檢體, lane 6 是以 0 μ M 濃度 lamotrigine 處理的檢體。 β -actin 訊號為實驗中

內部對照，經過 3 次以上的實驗結果，分析定量 lamotrigine (LTG)對 MJD 倍增蛋白的表達影響(圖 2-2)。由(圖 2-2)的柱狀圖分析顯示出在 200 μ M 的 lamotrigine (LTG)藥物處理後，相對於沒有處理藥物 (no treatment)或只加入 DMSO 處理，加入 200 μ M 的 lamotrigine (LTG)會使得倍增多醯胺羧酸 (polyglutamine)的 MJD 蛋白表現下降至多約 30 %，此結果是具有統計上的意義 ($p < 0.05$)。(圖 2-2)的柱狀圖分析也顯示 50 μ M、100 μ M、300 μ M 濃度的 lamotrigine (LTG)相對於沒有處理藥物(no treatment)或只加入 DMSO 處理，含倍增多醯胺羧酸 (polyglutamine)的 MJD 蛋白表達在統計上是沒有差異 ($P > 0.05$)。表示只有在 200 μ M 濃度的 lamotrigine (LTG)會降低致病的 MJD 蛋白表現。

另一方面，我們也使用另一種抗癲癇藥物，dilantin (Phenytoin)，來處理 SK-N-SH-MJD78 細胞株以作為實驗對照組，dilantin (Phenytoin)是臨床上有效地抑制強直-痙攣性發作之癲癇的藥物，可以降低靜止狀態或去極化狀態神經元之鈉離子電流，而使神經元細胞膜穩定而不使之去極化。因此，在 SK-N-SH-MJD78 細胞培養過程中，加入溶於 DMSO 的 dilantin 來處理細胞，將細胞株分別處理 50 μ M、100 μ M、200 μ M 與 300 μ M 濃度的 dilantin，經過 48 小時處理 dilantin 後，分析於 Western blot，結果顯示於(圖 2-3)。其中 lane 1 是 0 μ M 濃度 dilantin 處理的檢體，lane 2 是以 DMSO 處理的檢體，lane 3

是以 300 μM 濃度 dilantin 處理的檢體, lane 4 是以 200 μM 濃度 dilantin 處理的檢體, lane 5 是以 100 μM 濃度 dilantin 處理的檢體, lane 6 是以 50 μM 濃度 dilantin 處理的檢體 β -actin 訊號為實驗中內部對照, 經過 3 次以上的實驗結果, 經過定量分析結果, 在不同的 dilantin 濃度處理下含倍增的多醯胺麩胺酸 MJD 蛋白表現並無顯著的差異(圖 2-4)。

二、MJD 病人血液中 MJD 蛋白表現

以 MJD 病人服用 lamotrigine 藥物前後的週邊血液, 萃取其全蛋白, 以西方轉漬法分析服用 lamotrigine 藥物的前後 MJD 蛋白的變化, 本實驗以 MJD 單株抗體與 β -actin 的單株抗體(當內部控制組)為雜交探針, 並以 MJD 淋巴母細胞株的蛋白質萃取物為正控制組, 結果見圖 2-5 和圖 2-6。圖 2-5 為編號 A 的病人, 其 CAG 重覆序列分別是 20 和 78(實驗資料未附)。總蛋白萃取量固定為 95 μg , 其中的 lane1 為 MJD002 淋巴母細胞株當對照組, 其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 26 和 78(附表 2), lane 2 是病人服用 lamotrigine 藥物後的檢體, lane 3 是病人服用 lamotrigine 藥物前的檢體, lane 4 是 MJD003 淋巴母細胞株當對照組, 其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 15 和 78(附表 2)。實心箭頭代表含有倍增多醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產

物，空心箭頭代表正常醯胺麩胺酸多 MJD 蛋白產物，星號代表 β -actin 蛋白產物，。圖 2-6 為編號 B 的病人，其 CAG 重覆序列分別是 18 和 80(實驗資料未附)。總蛋白萃取量固定為 150 μ g，其中的 lane 1 是病人第一次服用 lamotrigine 藥物後的檢體，lane 2 是病人第二次服用 lamotrigine 藥物後的檢體，lane 3 為 MJD003 淋巴母細胞株當對照組，其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 15 和 78(附表 2)。實心箭頭代表含有倍增多醯胺麩胺酸 MJD 蛋白產物，空心箭頭代表正常醯胺麩胺酸多 MJD 蛋白產物，星號代表 β -actin 蛋白產物。本實驗取三個不同的個體的樣本，進行相同的實驗，其中圖 2-5 和圖 2-6 結果顯示血液中 MJD 致病蛋白與 MJD 正常蛋白並不會穩定出現，無法得到有意義的結果，可能與每次採取服用 lamotrigine 藥物之 MJD 病人的週邊血液時間不固定有關，亦或是病人每次生理狀況不同而影響 MJD 蛋白的表現。

討論

(Discussion)

本篇實驗所使用的 lamotrigine(LTG)是一種治療複合性或單純性的抗癲癇藥物，在動物實驗中，LTG 作用是經由阻斷 Voltage-dependent sodium channel 而使得樹突前神經元膜穩定，以避免釋放出刺激性的神經傳遞物質 glutamate。當老鼠暴露在 kainic acid (一種與 glutamate 接受器作用造成神經毒性的物質)，LTG 可以使老鼠避免神經毒性的產生。臨床藥物動力測試結果顯示，LTG 在成人血液中的半衰期為 29.6 小時 (Gilman, 1995)。臨床的觀察發現，LTG 用來治療 MJD 疾病具有專一性的減緩症狀的發生，但並無法痊癒，而 lamotrigine 對 MJD 的藥理作用機制目前未知?因此我們以穩定表達全長倍增 MJD 蛋白之人類神經腫瘤母細胞株(SK-N-SH-MJD78)為實驗模型，希望藉此更能知道 lamotrigine 對於 MJD 的藥理作用機制。在本篇論文實驗中，以不同濃度的 LTG 來處理 SK-N-SH-MJD78 細胞，觀察 LTG 對 MJD 蛋白的表現影響。發現在 200 μ M LTG 的濃度下處理細胞 2 天，能夠降低 20-30 % 的 MJD 致病的蛋白質產量。但是 LTG 濃度大於 300 μ M 時，MJD 致病的蛋白質產量又會提升，由於有 10 % 的病人服用 LTG 藥物後會產生副作用，包括頭暈(dizziness)、複視(diplopia)、運動失調 (ataxia)及嗜睡(somnolence) (Gilman, 1995)等。臨床治療觀察亦顯示當 LTG 劑量增加時，反而會加重運動失調的症狀，

可能與 LTG 的藥物副作用有關。

LTG 如何能使得 MJD 突變的蛋白質產量降低而減緩症狀的發生，推測 LTG 能夠經由直接或間接的影響 MJD 致病的蛋白質產量。LTG 如何影響多醯胺羧胺酸蛋白質的產量降低？根據先前的研究顯示，在老鼠的大腦的 striatum 及皮質中(HD 神經退化的位置)，發現 RNA 結合蛋白(RNA-binding protein)會與具有倍增的 CAG 重覆序列的 RNA 有專一性的交互作用，進而改變突變的 huntingtin 蛋白質的產量，而此 RNA 結合蛋白有組織特異性，可能因此影響其他蛋白的基因表現(McLaughlin et al., 1996)。推測若有 RNA 結合蛋白與致病 MJD 的 mRNA 交互作用，LTG 如果可促使 RNA 結合蛋白與致病的 mRNA 結合則可降低致病蛋白的產量，然而要證實此項推論，需有進一步的研究以尋找此可能存在的 mRNA 結合蛋白。另一方面，LTG 亦有可能抑制致病 MJD RNA 的表現量，進而使得致病蛋白表達量下降。但由於 MJD mRNA 於人體細胞的表現量極低，本實驗室在此方面的研究尚未得到具體結論。

LTG 對於 MJD 疾病的臨床效果亦可能來自降低神經細胞死亡的機制上，先前研究已知 LTG 除了作用阻斷 Voltage-dependent sodium channel 抑鈉離子內流，以避免釋放出刺激性的 neurotransmitter glutamate，我們知道突觸後神經元的細胞膜上有三個 L-glutamate 接受體分別是 NMDA(N-methyl-D-aspartate)

AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methoxy-4-isoxazole propionic acid) 和 Kainate(Nakanisht et al.,1998) , 這些接受體須在膜去極化和 glutamate 接合下才會被活化 , 而其中鈣離子會藉由 NMDA 接受體內流 , 並與鈣調節素(Calmodulin) 結合形成 Calcium/ Calmodulin 進而活化 NO 合成 (Nitric oxide synthase)和 Calcium/ Calmodulin 依賴性蛋白激酶 II。在人類 leukemia cells(Yabuki et al.,1997)和 neuronal excitotoxicity 中(Leist et al.,1997)已經證實 NO donor 會活化 caspase(cysteiny l aspartate specific proteinase)(Alnemri et al.,1996) , Cysteine proteases 家族 , 對許多細胞物質可特異性在其 Asp 殘基後加以切割 , 此種作用在線蟲類中 C.elegans 經基因分析後首次被認為和 apoptosis 有關(Salvesen et al.,1997; Nicholson et al.,1997; Cohen et al.,1997)。Caspase 被活化後會激發一連串瀑布式下游反應 , 最後活化 DNase 而將染色體分解而造成細胞程序性凋亡(Enari et al., 1998)。而近年來有文獻指出 LTG 亦會阻斷鈣離子內流 (Stefani et al.,1997)猜測 LTG 也可能藉此機制而降低神經細胞死亡。

由 CAG 三核 酸重覆序列所造成的疾病中發現 , 在 HD (Davies et al., 1997)、SCA1 (Skinner et al., 1997)、SCA3/MJD (Paulson et al., 1997)及 DRPLA (Igarashi et al., 1998)轉殖基因老鼠(transgenic mice)中均發現含多醯胺羧酸蛋白質在核內聚集累積形成包涵物 , 而且會造成運動神經退化性症狀出現 , 猜測

包涵物會影響神經退化的病程發展。最近研究指出大量表達熱休克性蛋白(HSP 40)時，可減少包涵物生成並改變多醯胺羧酸蛋白的毒性，認為神經退化並不是包涵物所造成的，包涵物只是將具有毒性的蛋白隔離具有保護作用。臨床發現，服用 LTG 藥物的 MJD 病人，發現運動失調的症狀有進步，眼肌移動速度漸漸增加，小腿肌肉張力增加，此臨床發現與最近的研究 (Yamamoto et al.,2000)認為 CAG 三核 酸重覆序列所造成的疾病其神經病理現象和運動失調的症狀可以改善具有一致性。若症狀的病程發展與包涵物有關，則推論 LTG 可以降低突變蛋白的表達量進而減緩多醯胺羧酸蛋白質在核內形成包涵物的速度，延遲致病蛋白進入細胞核內形成包涵物，增加致病蛋白在細胞質被泛激酶蛋白水解 (Ubiquitin-proteasome)降解機率，而使得症狀緩解。然而若要進一步證實這些假說，均需其它的實驗來支持。

若從近年來對 CAG 三核 酸重覆序列所造成的疾病的研究，推測整個致病過程大致分四個階段(1)致病蛋白生成(2)致病蛋白經泛激酶蛋白水解 途徑(UPP)而水解成具有更強毒性的短片段蛋白(3) 短片段蛋白和未被水解的致病蛋白進入細胞核並與其它蛋白形成不可溶性包涵物(4)未形成不可溶性包涵物之短片段蛋白在核內有特異性毒性造成神經細胞喪失功能甚至死亡，而此死亡一般認為與細胞程序性凋亡有關(表 2)，所以未來 MJD 治療的策略，可能有如下方式：

(1) 抑制或減少致病蛋白量:

當 Ubiquitin ligase(E3)喪失功能時會加速 SCA1 的病癥 (Cumming et al.,1999)因此泛激素蛋白水解途徑(UPP)中的酵素活性相當重要，除了可利用基因治療亦可設計專一性的蛋白水解增加致病蛋白降解速率，或是利用本論文中提到的 LTG 藥物，但其相關正確機制仍有待進一步實驗證明。

(2) 中和突變蛋白或改變突變蛋白構形:

在 1994 年 Alain 等人曾認為可應用具有 CAG 三核酸重覆序列的相關抗體，例如單株抗體 1C2(屬於 Anti-TATA bind protein)，利用 CAG 重覆序列區域交互作用而中和具毒性的蛋白片段，其 CAG 重覆序列愈長結合能力愈好，或是大量表達熱休克性蛋白，在 SCA1、SCA3、ALS 的細胞模型中(Cummings et al.,1998; Bruening et al., 1999; Chai et al.,1999)以及果蠅轉殖基因模型中(Warrick et al.,1999)，當大量表達熱休克性蛋白(HSP 40)時，可減少生成包涵物並改變多醯胺羧酸蛋白的毒性。

(3) 抑制細胞程序性凋亡(apoptosis):

由於細胞程序性凋亡機轉可以分為凋亡中心機轉與各種凋亡訊息傳遞途徑，因此治療藥物設計上可以針對中心機轉的調控或特定訊息途徑的調控兩種。屬於中心機轉的藥物標的有 Bcl-2 家族、Cytochrome C、Apaf-1 及 Caspases 家族等重要蛋白分子;而屬於訊息途徑的藥物標的有細胞質膜外的 Ligand 膜

上受體、胞膜內的 FADD 等訊息傳遞蛋白和一般訊息因子如 ROS(reactive oxygen species)、自由基、Glutathion 等。例如在運動神經元細胞如果外加神經滋養因子(阻斷 Cytochrome C 釋放)或加入 IETG(Caspase-8 抑制劑)可抑制神經細胞進行細胞程序性凋亡(Brigitte et al.,1999)。

由於 MJD 目前尚無有效的治療方法，而且是一種晚發型的遺傳疾病，大多數在成年以後才發病，對家庭與社會都是一大負擔。因此若能更有效控制其病程發展，了解 LTG 的作用途徑進而了解 MJD 致病機轉，相信將來可以提供對 MJD 患者治療上和 MJD 的相關研究有很大的助益！

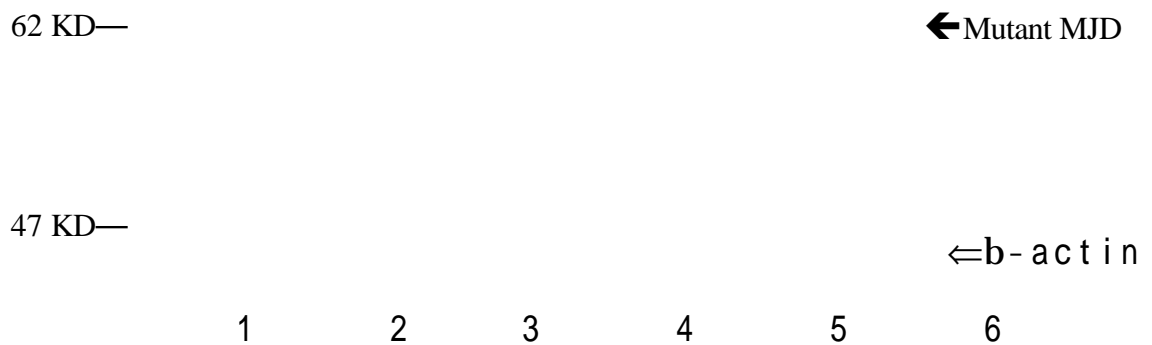


圖 2-1 SK-N-SH-MJD78 細胞株經由不同濃度 lamotrigine 處理 48 小時之後 MJD 蛋白的表現，b-actin 為內部對照。

其中 lane 1 是 50 μM 濃度 lamotrigine 處理的檢體，lane 2 是以 100 μM 濃度 lamotrigine 處理的檢體，lane 3 是以 200 μM 濃度 lamotrigine 處理的檢體，lane 4 是以 300 μM 濃度 lamotrigine 處理的檢體，lane 5 是以 DMSO 處理的檢體，lane 6 是以 0 μM 濃度 lamotrigine 處理的檢體。實心箭頭代表含有 78 個醯胺羧胺酸(polyglutamine) MJD 蛋白產物，空心箭頭代表 β -actin 蛋白產物。

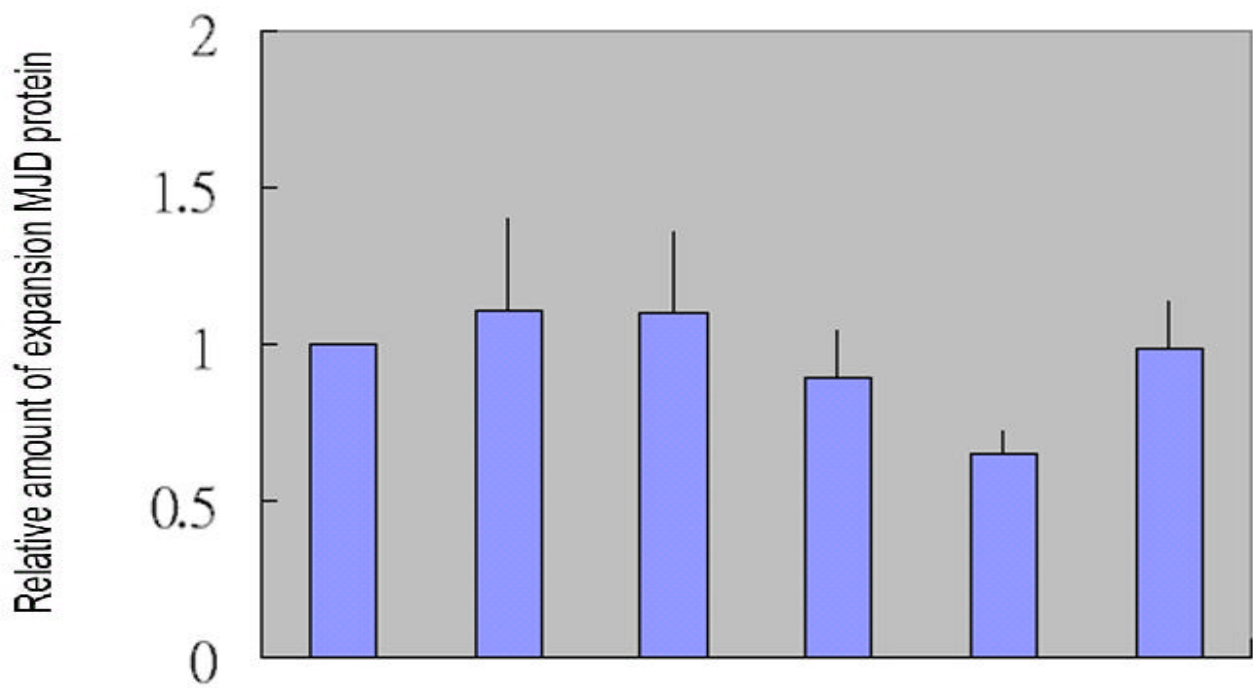


圖 2-2 處理不同濃度 lamotrigine 48 小時之後 MJD 蛋白表達經各別獨立的 T 檢定(independent T-test)之統計。星號代表 $p < 0.05$ 具有統計意義。

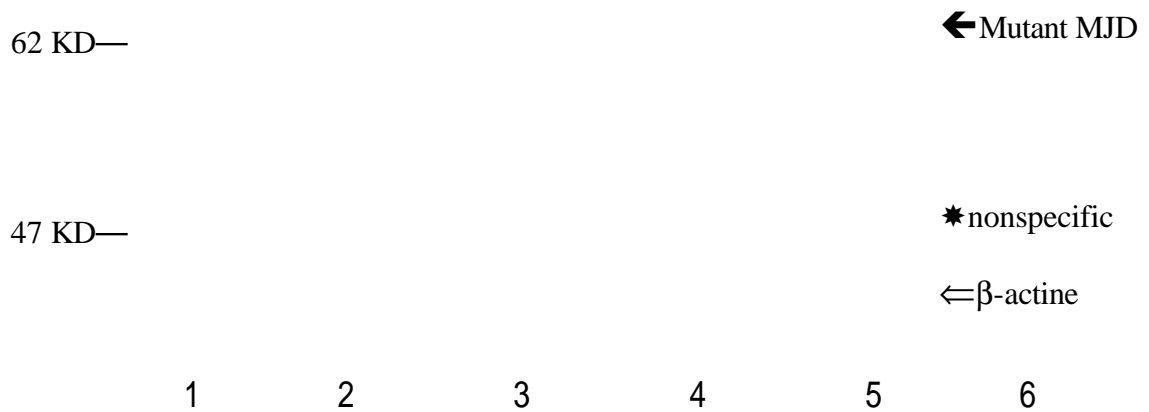


圖 2-3 SK-N-SH-MJD78 細胞株經由不同濃度 dilantin 處理 48 小時之後 MJD 蛋白的表現，b-actin 為內部對照。

其中 lane 1 是 0 μM 濃度 dilantin 處理的檢體，lane 2 是以 DMSO 處理的檢體，lane 3 是以 300 μM 濃度 dilantin 處理的檢體，lane 4 是是以 200 μM 濃度 dilantin 處理的檢體，lane 5 是是以 100 μM 濃度 dilantin 處理的檢體，lane 6 是是以 50 μM 濃度 dilantin 處理的檢體，實心箭頭代表含有 78 個醯胺羧胺酸 (polyglutamine) MJD 蛋白產物，空心箭頭代表 β -actin 蛋白產物，星號代表非特異性交叉反應。

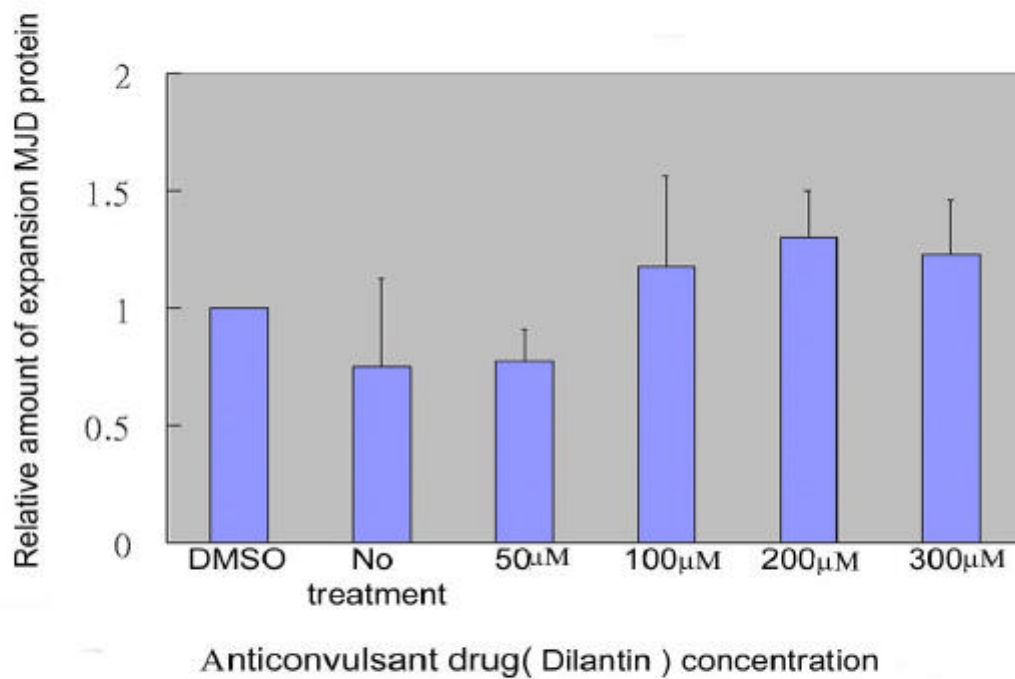


圖 2-4 處理不同濃度 dilantin 48 小時之後 MJD 蛋白表達經各別獨立的 T 檢定(independent T-test)之統計。



圖 2-5 服用 lamotrigine 藥物前後病人週邊血液的 MJD 蛋白表現。
為編號 A 的病人，其 CAG 重覆序列分別是 20 和 78(實驗資料未附)。

其中的 lane1 為 MJD002 淋巴母細胞株當對照組，其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 26 和 78(附表 2)，lane 2 是病人服用 lamotrigine 藥物後的檢體，lane 3 是病人服用 lamotrigine 藥物前的檢體，lane 4 是 MJD003 淋巴母細胞株當對照組，其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 15 和 78(附表 2)。

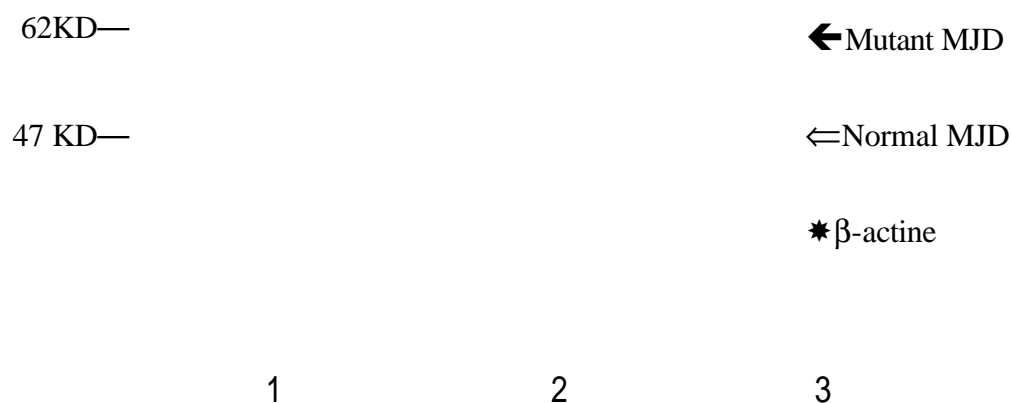


圖 2 - 6 服用 lamotrigine 藥物後病人週邊血液的 MJD 蛋白表現。
 為編號 B 的病人，其 CAG 重覆序列分別是 18 和 80
 (實驗資料未附)。

其中的 lane 1 是病人第一次服用 lamotrigine 藥物後的檢體，lane 2 是病人第二次服用 lamotrigine 藥物後的檢體，lane 3 為 MJD003 淋巴母細胞株當對照組，其 MJD 基因中 CAG 重覆序列分別是 15 和 78(附表 2)。

第三章

利用免疫沉澱法尋找與 MJD 致病蛋白有交互作用之蛋白

Immunoprecipitation Assay For Putative Protein(s) Interacted With Mutant ataxin-3

中文摘要

Machado-Joseph Disease (MJD)是屬於體染色體顯性遺傳神經退化性疾病其中一種，又名為小腦脊髓運動失調症第三型(SCA3)，發病原因與其基因座內 CAG 三核 酸重覆序列倍增突變有關。而對於此段含有三核 酸重覆序列所轉譯出的多醯胺麩胺酸 (poly-glutamine) 蛋白產物之正常功能與致病機轉尚未明瞭。只知道此段核 酸重覆序列愈長則病症愈嚴重且經由病人腦部病理切片以細胞免疫染色實驗得知 MJD/ataxin-3 蛋白會聚積於腦部神經核內形成包涵物並猜測此核內包涵物會影響神經退化的病程發展而核內包涵物究竟是促使神經細胞走向細胞程序性凋亡 (apoptosis)，亦或是保護神經細胞，其作用並不清楚。目前只知道此核內包涵物組成含有全長 MJD 致病蛋白、致病 MJD 蛋白片段、正常 MJD 蛋白、泛激素 (Ubiquitin) 以及一些熱休克蛋白等等、是否還包括其它蛋白並不清楚。我們利用之前實驗室所製備的 MJD 多株抗體與正常的人類神經腫母細胞株 (SK-N-SH) 和含突變 MJD 蛋白淋巴母細胞株進行免疫沉澱反應，希望藉由蛋白和蛋白間的交互作用來尋找會與 MJD 蛋白有相互作用的蛋白。結果發現有許多非特異性反應的蛋白出現，與實驗對照組比較後，雖然尚未如預期得到明顯特異性的蛋白出現，然而在大約 70kDa 蛋白位置有一個比較弱的反應，值得後續研究。許多非特異性反應的蛋白出現可能與所用的抗體純度不夠有關，因此，我們將進一步純化此 MJD 多株抗體，再者，亦有可能是神經細胞所表達的 MJD 蛋白量太少，所以反應太弱無法被測定出來，因此，將 MJD 蛋白表達量增加也

是未來改進的方法之一。

英文摘要

(Abstrace)

Machado-Joseph disease(MJD) is caused by unstable CAG trinucleotide repeat expansion in the coding region of the MJD gene. It is known that expanded polyglutamine tracts cause ataxin-3 and other proteins to accumulate and aggregate in neuronal nuclei of affected brain regions. Whether the intranuclear aggregation of a polyglutamine protein initiates cellular pathology remains controversial. It was shown previously that intranuclear inclusions contain the full-length ataxin-3, truncated ataxin-3, ubiquitin, heat shock proteins and other unknown proteins. In order to understand the functional role(S) of mutant ataxin-3 through it's interacted protein(s), we performed immunoprecipitation assay to search for any putative protein which may interact with the mutant ataxin-3. Polyclonal antisera against ataxin-3 were used to precipitate ataxin-3 together with associated proteins, if any, from the mixture of total protein extracts from SK-N-SH cells and patient's lymphoblastoid cells. Compared to control experiment, however, no clear specific signals were observed in the assay except one weak signal around 70 kDa. Further improvement in antibody preparation and enrichment of protein

concentration will be undertaken in the near future.

序論

(Introduction)

近年來發現至少有十一種疾病與三核 酸重覆序列(trinucleotides repeat)有關 (Sutherland and Richaeds, 1995)。目前對於三核 酸重覆序列所造成的疾病中以亨汀頓氏舞蹈症和小腦脊髓運動失調症第一型所知道的相關交互作用的蛋白較多，在小腦脊髓運動失調症第一型方面，發現 SCA1 基因產物 ataxin-1 與下列蛋白有蛋白之間的交互作用 (1) 醣解酵素中的甘油醛三磷酸去氫 (glyceraldehyde-3-phosphate)，猜測神經退化與 ATP 能量代謝失常有關(Beena et al., 1996)，(2)富含白胺酸之酸性核內蛋白(Leucine-rich acidic nuclear protein;簡稱 LANP)而 LANP 是屬於 LRRs 的一族，LRRs 是廣泛存在生物體內的蛋白目前已知有一些是與早期形態發生及細胞黏著有關。而在亨汀頓氏舞蹈症方面，發現(1) 在老鼠的大腦的 striatum 及皮質中(HD 神經退化的位置)，有一個分子量為 63kDa 的 RNA 結合蛋白(RNA-binding protein)會與倍增的 CAG 重覆序列有專一性的交互作用，進而改變突變的 huntingtin 蛋白質的產量，此 RNA 結合蛋白而且有組織特異性，同時影響 mRNA 在細胞上的位置，改變其他蛋白的基因表現(McLaughlin et al., 1996)。(2)另外 HD 也跟麩胺酸轉移 (Transglutaminase;簡稱 TGase)的活性有關，發現隨著年齡增加，正常人的 TGase 活性會下降而 HD 病人其 TGase 活性卻會增加(Lucio et al., 1996)。而目前已知當大量表達 TGase 於人類神經腫瘤細胞時會引起自發性細胞凋亡並使細胞易受刺激而死亡(Lucia et al.,

1999)。由此可知目前對與醯胺麩胺酸重覆序列有交互作用的蛋白所知有限。

然而由先前研究報告得知，在人體個各組織均可偵測出 MJD 基因轉譯出來的蛋白產物(MJD/ataxin-3)，包含多醯胺麩胺酸倍增的致病 MJD 蛋白，與正常的蛋白 (Trottier et al., 1995)而這些蛋白一般情況下是位於細胞質的部位。然而只有腦部中的深側基底核、腦幹、脊柱、小腦部是 MJD 病症所在(Sachdev et al., 1982; Yuasa et al., 1986; Takiyama et al., 1994)，雖然對 MJD 蛋白的正常功能與致病機轉制仍不清楚，但已知 MJD 基因中倍增的 CAG 重覆序列會誘發神經細胞的死亡，這種組織特異性死亡現象是否能代表腦部組織細胞中特異表達的蛋白參與致病 MJD 蛋白引發細胞毒害的過程？近年來研究並且顯示出 MJD/ataxin-3 蛋白累積於腦部神經細胞核內形成包涵物(Paulson et al., 1997)，為何人體生理上只在腦部病灶處產生包涵物目前並不知道？致病 MJD 蛋白，是否可能藉由和其他蛋白間的交互作用 (Paulson et al., 1997)進而造成神經退化病徵，仍然不清楚，有待更進一步的研究和探討。

而目前的參考文獻中對於神經細胞核內形成包涵物只知道包含有全長倍增醯胺麩胺酸醯的 MJD 蛋白、醯胺麩胺酸倍增片段、正常的 MJD 蛋白、泛激素(Ubiquitine)及一些熱休克蛋白等等、是否還包括其它蛋白並不清楚，而且對於醯胺麩胺酸倍增片段或全長倍增醯胺麩胺酸的 MJD 蛋白如何進入細胞核內，並且引起堆積的機制並不了解。所以我們想利用免疫沉澱法來尋找與 MJD 蛋白有關的蛋白，在

利用此蛋白原先的功能來推測 MJD 致病的機轉。

材料與方法

(Material and Method)

一、細胞株來源:

1. 淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL): 由中山醫院神經內科呂聰明醫師所提供 MJD 疾病患者抽取的血液，然後由中山醫學院細胞遺傳室李宣佑教授將之建立成淋巴母細胞株。
2. 人類神經腫瘤母細胞株(Neuroblastoma cell line;SK-N-SH): 由臺中榮民總醫院教學研究部徐士蘭博士所提供。

二.細胞培養:

人類神經腫瘤母細胞株(SK-N-SH;neuroblastoma cell)培養在 25T 的培養瓶，所用的培養液為 90 % DMEM，10 % FBS，1 % NEAA，1 % PSN，1 % L-glutamine (GIBCO BRL)。爾後每兩天換一次細胞培養液，將培養瓶置於 37℃，5 %二氧化碳培養箱。而淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL)培養在 25 cm² 的培養瓶，所用的培養液為 90 % RPMI-1640，10 % FBS，1 % PSN(GIBCO BRL)。爾後每三天換一次細胞培養液，將培養瓶置於 37℃，5 %二氧化碳培養

箱。

三.細胞標示放射線 S^{35} -Methionine

淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL)部份:

淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL)細胞培養到 5×10^6 個細胞數後以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取細胞液轉移到 15 ml 尖底離心管，以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) ，10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物，加入 10 ml RPMI-1640 培養液(methionine-free) 沖洗以，以 10 ml 的無菌玻璃吸管上下吸取，將細胞沉澱物打散後再離心 1500 rpm (HITACHI 05P21, Japan) ，10 分鐘。之後倒掉細胞培養液，加入 modified 的細胞培養液(RPMI-1640 methioine-free , 1 %FBS , 1 %PSN , 1 %L-glutamine , 100 % sodium pyruvate , 10 μ Ci/ μ l S^{35} -Methionine)置於 37 ，5 %二氧化碳培養箱培養一小時。

人類神經腫瘤母細胞株(Neuroblastoma cell line;SK-N-SH)部份:

人類神經腫瘤母細胞株培養達到 8 分滿時，以 10 ml 無菌玻璃吸管吸取細胞廢液並丟棄，加入 10 ml DMEM 培養液(methionine-free) 沖洗，以 10 ml 的無菌玻璃吸管上下吸取將細胞沉澱物打散後再以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) ，10 分鐘。之後倒掉細胞培養液，加入 modified 的細胞培養液(DMEM methioine-free , 1%FBS ,

1 %PSN , 1 %L-glutamine , 1 % sodium pyruvate , 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ S^{35} -Methionine)置於 37 , 5 %二氧化碳培養箱培養一小時。

四. 細胞蛋白質的抽取:

淋巴母細胞(Lymphoblastoid cell line; LCL)以 10 ml 的無菌玻璃吸管吸取細胞液轉移到 15 ml 尖底離心管, 以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) , 10 分鐘, 倒掉上清液留下細胞沉澱物。而人類神經腫瘤母細胞株將培養於 25 cm^2 培養皿中達八分滿時, 將培養液吸出, 加入 5 ml 1 倍 PBS 清洗 3 次, 再用刮杓將細胞刮下, 用 10 ml 的無菌玻璃吸管吸取 buffer 連同細胞一起轉移到 15 ml 尖底離心管, 以 1500 rpm 離心(HITACHI 05P21, Japan) , 10 分鐘。倒掉上清液留下細胞沉澱物。

然後加入 500 μl 的蛋白萃取緩衝溶液 (10 倍 PBS, 5 % glycerol , 1 mM sodium EDTA , 1 mM sodium EGTA , 1 mM dithiothreitol (DTT) , 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin , 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin , 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.5 % Triton X-100) , 混合之後, 以超音波震盪器(MISONIX XL2020, USA)以頻率 8 連續震盪 30 秒之後停留 1 分鐘, 重覆 3 次。之後以冷凍離心機(Beckman AVANTI30, USA)設定溫度在 4 下以 15000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液, 並將此上清液保存於 -20 。

五. 蛋白定量分析

以 Bio-Rad 試劑測蛋白濃度。首先以 1:4 之比例混合 Bio-Rad 試劑和水成為 Bio-Rad working reagent , 並取待測物 10 μ l 與標準品(BSA)5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1 ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後, 以分光光度儀(Beckman DU640,USA) 於波長 595 nm 測吸光值(OD₅₉₅) , 再與標準蛋白(Bovine serum albumin; BSA)比較以求得待測物之蛋白濃度(μ g/ μ l)。

六、免疫沉澱法分析:

在兩個 1.5 ml 的微量離心管(microcentrifuge tube)中, 分別加入體積 30 μ l protein A agarose (BRL)和體積 60 μ l anti-rabbit polyclonal antibody 及體積 10 μ l 的 1 倍的 TBS buffer (20 ml 1M Tris pH7.4, 9.0 g NaCl, 加二次水到 1000 ml)使總體積為 100 μ l 的溶液, 並且在 4°C 下以 end-over-end 方式旋轉作用 16 小時, 之後加少許的 TBS 緩衝液將殘留於管壁上的 protein A agarose 帶下, 防止 protein A agarose 大量流失, 再以轉速 6000 rpm 離心 5 分鐘去除上清液留下沉澱物, 再用 200 μ l TTBS 緩衝液(20 ml 1M Tris pH7.4, 9.0 g NaCl, 0.05 % Tween 20, 加 d2H₂O 至 1000ml)洗三次。分別取前一步驟所萃取的總蛋白量為 60 μ g 的淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell line; LCL)全蛋白萃取液當作實驗控制組和總蛋白量為 60 μ g 中分別含有 30 μ g 總

蛋白量的淋巴母細胞株及 30 μg 總蛋白量的人類神經腫瘤母細胞之全部混合全蛋白萃取液當作實驗對照組，分別加入已和多株抗體作用 16 小時後的 protein A agarose，並在 4°C 下以 end-over-end 方式旋轉作用 2 小時，反應完後以轉速 6000rpm 離心 5 分鐘，再將上清液轉移到新的 1.5 ml 微量離心管，上清液用 200 μl TTBS 緩衝液沖洗三次，而沉澱物則用 200 μl TTBS 緩衝液沖洗三次。

七、SDS-聚丙烯醯板膠電泳法:

分別取 20 μl 體積的上清液和 20 μl 體積的沉澱物，依序分別加入 10 μl 蛋白裝載染液 (loading dye)，然後在 95 (THERMOLYNE 17600, USA) 下作用 5 分鐘。再將反應溶液依序加入膠體凹槽中，將電源供應器 (Bio-Rad PAC300) 固定在 80 伏特，在 1 倍的電泳緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) 下進行膠體電泳分析。而 10 % SDS-聚丙烯醯板膠製備如下:

10 % SDS-PAGE

	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide-bisacrylamide (29:1)	2.5 ml	0.562 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml	

0.5M Tris-HCl pH6.8		1.25 ml
10 % SDS	0.1 ml	0.05 ml
10 % ammonium persulfate	75 μ l	15 μ l
TEMED	15 μ l	4 μ l
d ₂ H ₂ O	5 ml	3.188 ml

結果與討論

圖 3-1 為利用免疫沉澱法所得到的結果，其中 lane 1 是代表實驗控制組中淋巴母細胞株及人類神經腫瘤母細胞株之全部混合蛋白萃取液反應基質之上清懸浮液，lane 2 是代表實驗控制組中淋巴母細胞及人類神經腫瘤母細胞之全部混合蛋白萃取液反應基質之沉澱物，lane 3 是代表實驗對照組中淋巴母細胞之全部混合蛋白萃取物反應基質之上清懸浮液，lane 4 是代表實驗對照組中淋巴母細胞株之全部混合蛋白萃取物反應基質之沉澱物。箭頭代表微弱的特異性蛋白反應位置。從圖上結果並未能發現明顯的特異性反應。

在整個實驗設計上，我們是想利用本實驗室之前自行製備 MJD 多株抗體(許秀美論文, 1998)，由於蛋白質 A 會和免疫球蛋白 Fc 部位特異性結合，而附著於含有蛋白質 A 的 agarose 上，再分別與實驗對照組含有致病蛋白淋巴母細胞株的全蛋白萃取液，及實驗控制組中混合全蛋白萃取液中含有致病蛋白淋巴母細胞株蛋白萃取物，和正常人類神經腫瘤母細胞株蛋白萃取液共同混合後作孵育(incubation)，因為依目前現有研究文獻顯示 MJD 主要病灶是在神經部位，所以正常人類神經腫瘤母細胞株蛋白萃取物主要目的是提供能與 MJD 蛋白作用的蛋白因子。的從本次實驗結果圖 3-1 中我們可以看到雖然在約 70kDa 位置有一比較弱的特異性反應，但有許多非特異性反應的蛋白出現，而並沒有明顯的特異反應蛋白出現，此結果可能與所用的 MJD 多株抗體純度不夠有關，所以造成非特異性交叉反應，至於抗原和抗體之間的非特異性反應的原因可能有下列數點：(1) 抗原的異質性，大分子的蛋白質，它會有很多抗原決定區，這些不同的抗原決定區產

生的不同抗休都能和原來的大分子抗原結合，會造成特異性不佳，無法分辨出大抗原上不同的抗原決定區。(2)不同的抗原共有相同的抗原決定區，如果二個抗原中，每一個抗原都有二個以上的抗原決定區，尤其是多株抗血清時，會造成此抗休分不出二種不同抗原，我們即稱交叉反應。(3)不同的抗原因為構造上類似而共有類似的抗原決定區。另一種可能則來自神經細胞株內 MJD 蛋白表達量太少，因此，要改進此實驗可以從下面幾個方向來著手：(1)將此 MJD 多株抗體作進一步純化，或是改用 MJD 的單株抗體，之前所以考慮採用此 MJD 多株抗體主要是考慮到 MJD 多株抗體具有多個 MJD 蛋白抗原決定位，敏感度高，而 MJD 單株抗體雖然較具有特異性，但是有可能 MJD 蛋白抗原決定位易被其相關蛋白因交互作用產生立體性阻礙(blocking)而使得敏感度低，(2)由於神經細胞不像原核細胞可以大量產生 MJD 基因產物，因此，未來將 MJD 致病基因從 pcDNA3-HA-MJD78 的質體(表 3)，利用 BamHI 限制 切割出來，以此片段作為插入子(insert)，接入 PQE30 質體中 BamHI 位置，將此兩個片段接合起來形成新的含有可表達全長 MJD 基因之質體 DNA(表 7)。由於 PQE30 質體轉殖入原核細胞後可藉由此質體而大量表達 MJD 蛋白，另外此 PQE30 質體有另一特性就是在 N 端帶有 6 個組胺酸(Histidine)的標幟，由於組胺酸苯環上的氮(N)原子與鎳(Ni)金屬產生特異性接合，而鎳金屬又會與附著與固相支持物上的 Nitri lotriacetic acid 特異性鍵結，因此，可利用組胺酸與 Ni-NTA(Nickel-Nitri lotriacetic acid)作用而純化出前端帶有 6 個組胺酸標幟的 MJD 蛋白，因此，利用此質體應該可以獲得

大量且純度高的 MJD 蛋白(表 9)。

另一方面近年來的文獻顯示包涵物的形成，大部份是藉由截斷的致病 MJD 蛋白所調控，因此，我們也設計了一個可以被原核啟動子所調控的截斷的致病 MJD 蛋白之質體，首先利用 Pst I 和 EcoRI 兩個限制 切割產生含有截斷的致病 MJD 蛋白部份，以作為插入子，而在載體方面，可利 PQE31 質體可作為載體，因此，將此兩個片段接合起來形成新的含有可表達截斷 MJD 基因之質體 DNA(表 8)。

目前研究蛋白質之間的交互作用常用的方法有酵母菌雙雜合法 (yeast two hybrid)和本論文所採用的免疫沉澱法，我們選擇利用免疫沉澱法來尋找與 MJD 有關的蛋白，免疫沉澱法另一個優點是可以濃縮大體積檢體中微量抗原。雖然目前並未有文獻發現與 MJD 蛋白有關的蛋白，但圖 3-1 中，約 70 kDa 左右的微弱訊號，是我們需要進一步研究的，希望將目前實驗方法改進，已儘快找出與 MJD 蛋白有關的蛋白，為明瞭 MJD 致病機轉更向前一步。

Sample Control

S P S P

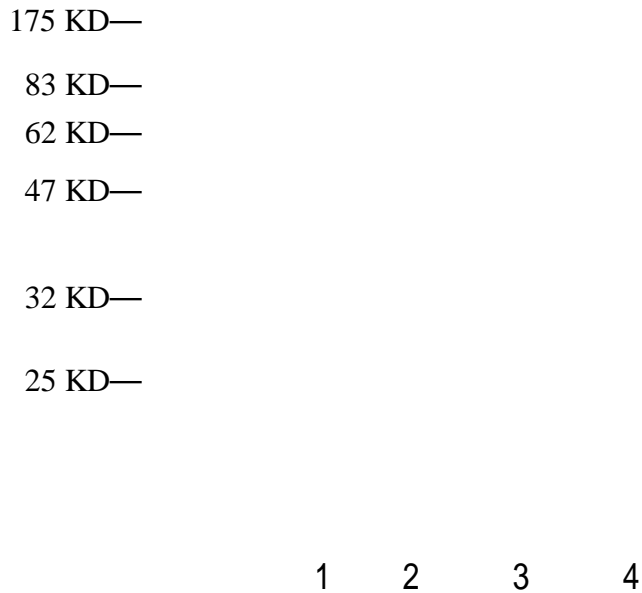


圖 3 - 1 免疫沉澱法分析結果。(箭頭代表微弱非特異反應)

Sample 是代表實驗控制組中淋巴母細胞株及人類神經
腫瘤母細胞株之全部混合蛋白萃取液反應基質。

Control 是代表實驗對照組中淋巴母細胞之全部混合蛋
白萃取物反應基質。

S 是指上清液(supernatant);P 是指 Pellet。

附錄 (Appendixes)

表 1 Molecular classification of autosomal dominant cerebellar ataxias(ADCA)

表 2 Machado-Joseph Disease 致病機轉假設圖

表 3 pcDNA3-HA-MJD 78 質體

表 4 MJD 病人之淋巴母細胞株

表 5 利用 SLST (single leg standing test) 來評估 MJD 病人症狀改善。

表 6 利用 QTG-D(qualitative tandem gait timing)來評估 MJD 病人症狀改善

表 7 pQEHAJMJD78 蛋白表現質體的建構

表 8 pQEHAJMJD78 蛋白表現質體的建構

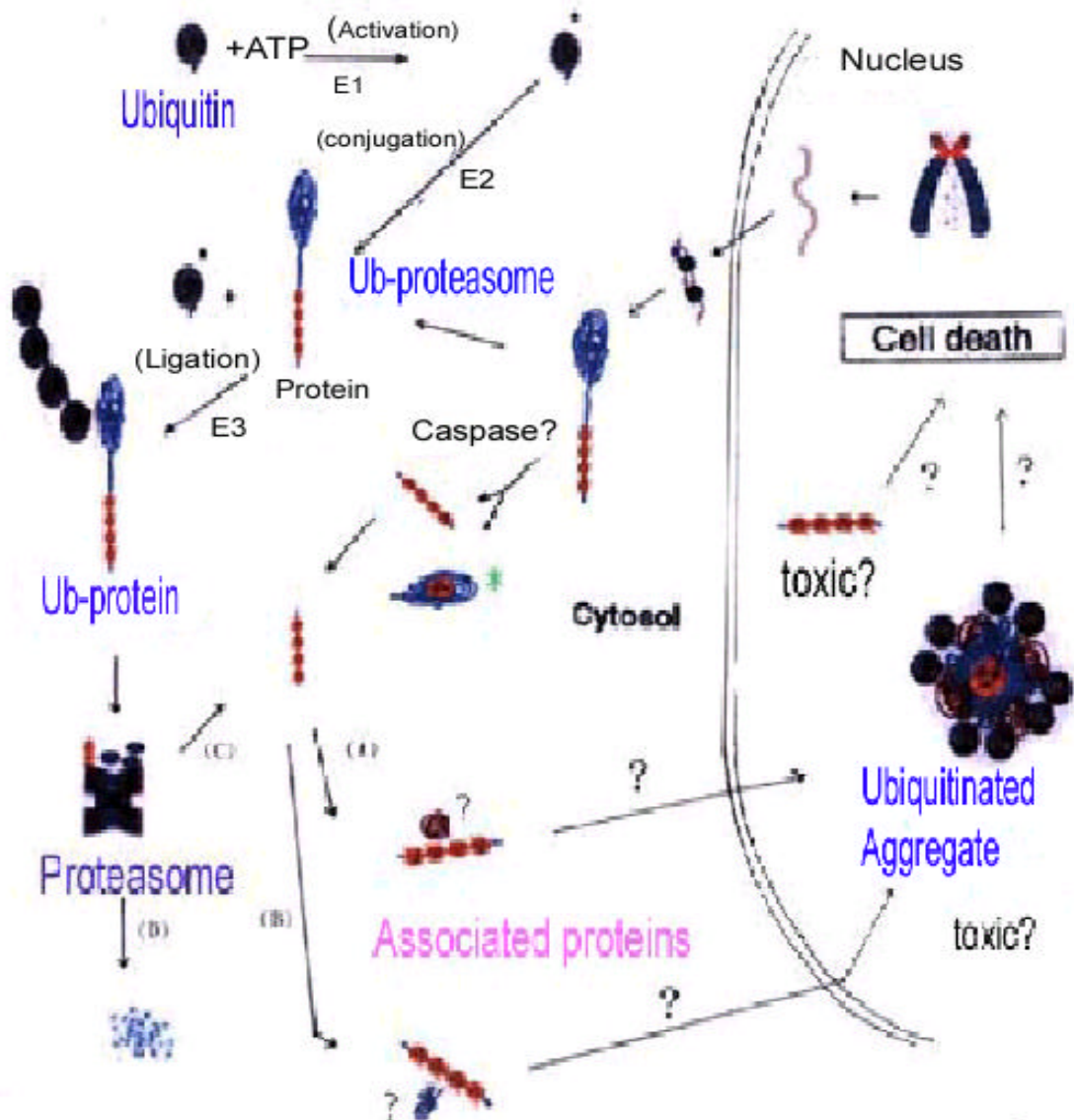
表 9 Ni-NTA 純化抗體示意圖

表 1

Disease	Sites of neuropathology	Repeat number		Gene product (intracellular localization)
		Normal	Disease	
Huntington's disease(HD)	striatum(medium spiny neurons)and cortex in late stage	6-35	36-121	Huntingtin (c)
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	Cerebellar cortex (purkinje cells), dentate nucleus and brainstem	6-39	40-81	Ataxin-1(n,c)
Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)	Cerebellum, pontine neuclei, substantia nigra	15-29	35-64	Ataxin-2 (c)
Spinocerebellar ataxia type 3(SCA3) or Machado-Joseph disease(MJD)	Substantia nigra, globus pallidus, pontine nucleus, cerebellar cortex	13-42	61-84	Ataxin-3 (c)
Spinocerebellar ataxia type 6(SCA6)	Cerebellar and mild brainstem atrophy	4-18	21-30	Calcium channel subunit ($\alpha 1A$)(m)
Spinocerebellar ataxia type 7(SCA7)	Photoreceptors and bipolar cells, cerebellar cortex, brainstem	7-17	37-130	Ataxin-7 (n)
Spinobulbar muscular atrophy(SBMA)	Motor neurons(anterior horn cells, bullar neurons) and dorsal root ganglia	11-34	40-62	Androgen receptor (n)
Dentatorubral-Pallidolusian atrophy(DRPLA)	Globus pallidus, dentatorubral and subthalamic nucleus	7-35	49-88	Atrophin (c)

* c, cytoplasmic; m,transmembrane; n, nuclear
(adopted from Lunjes A. and Mandel J.L., 1997)

表 2 Machado-Joseph Disease 致病機轉假設圖



Michael D. Kaytor 1999
 Thomas Klockgether 1998

表 3 pcDNA3-HA-MJD 78 質體

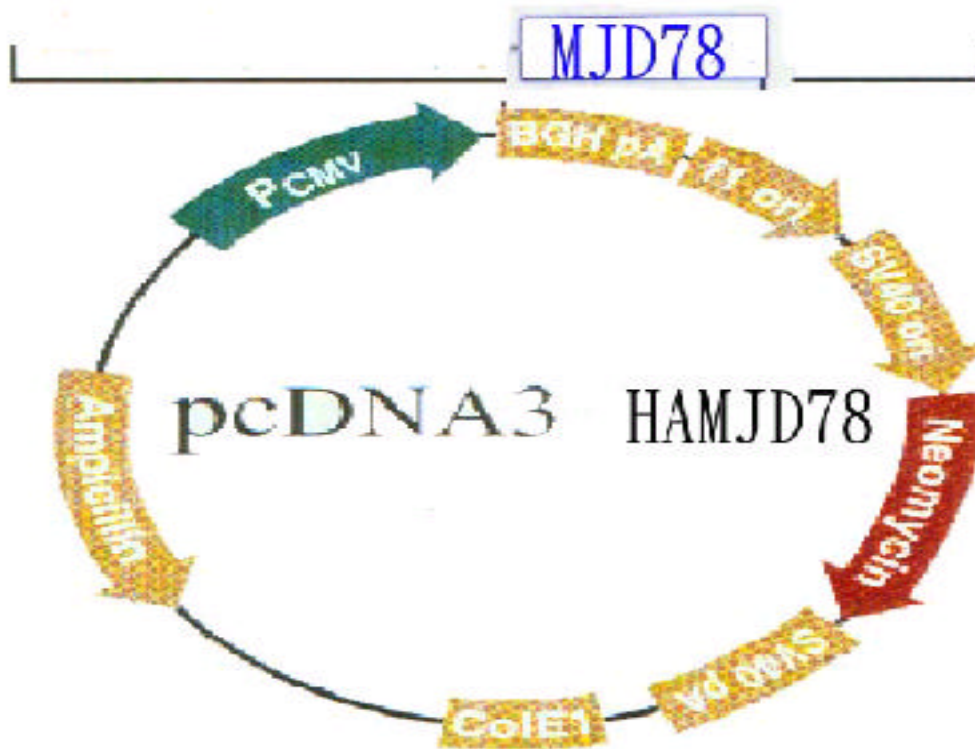
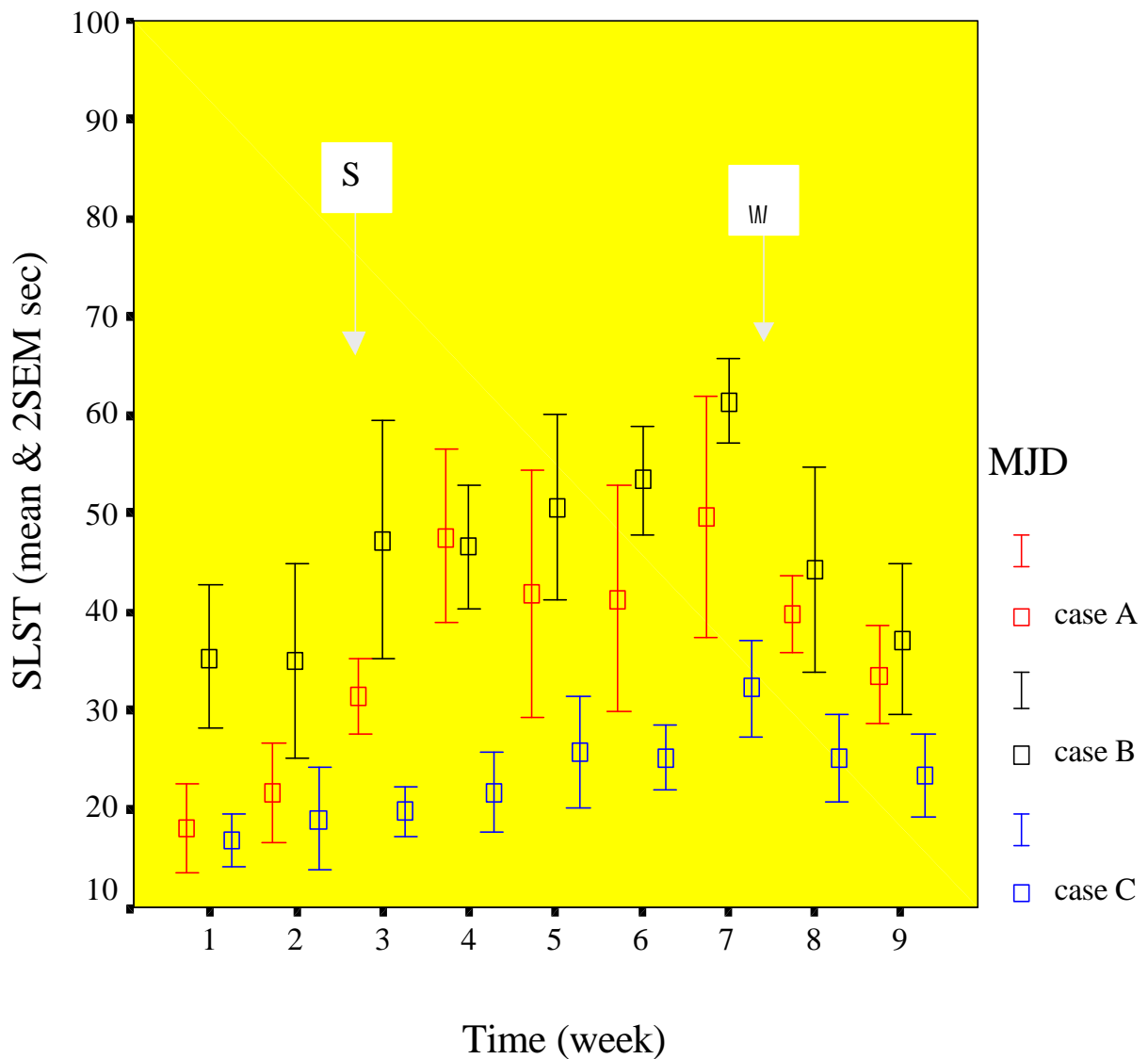


表 4 MJD 病人淋巴母細胞株

樣本編號	年齡	MJD基因中 CAG重覆次數	發病年齡
MJD001	40	23, 78	36歲
MJD002	23	26, 78	未發病
MJD003	26	15, 78	未發病
MJD004	30	16, 84	25歲
MJD005	6	16, 85	未發病
MJD006	46	25, 83	31歲

(摘錄楊千瑩碩士論文)

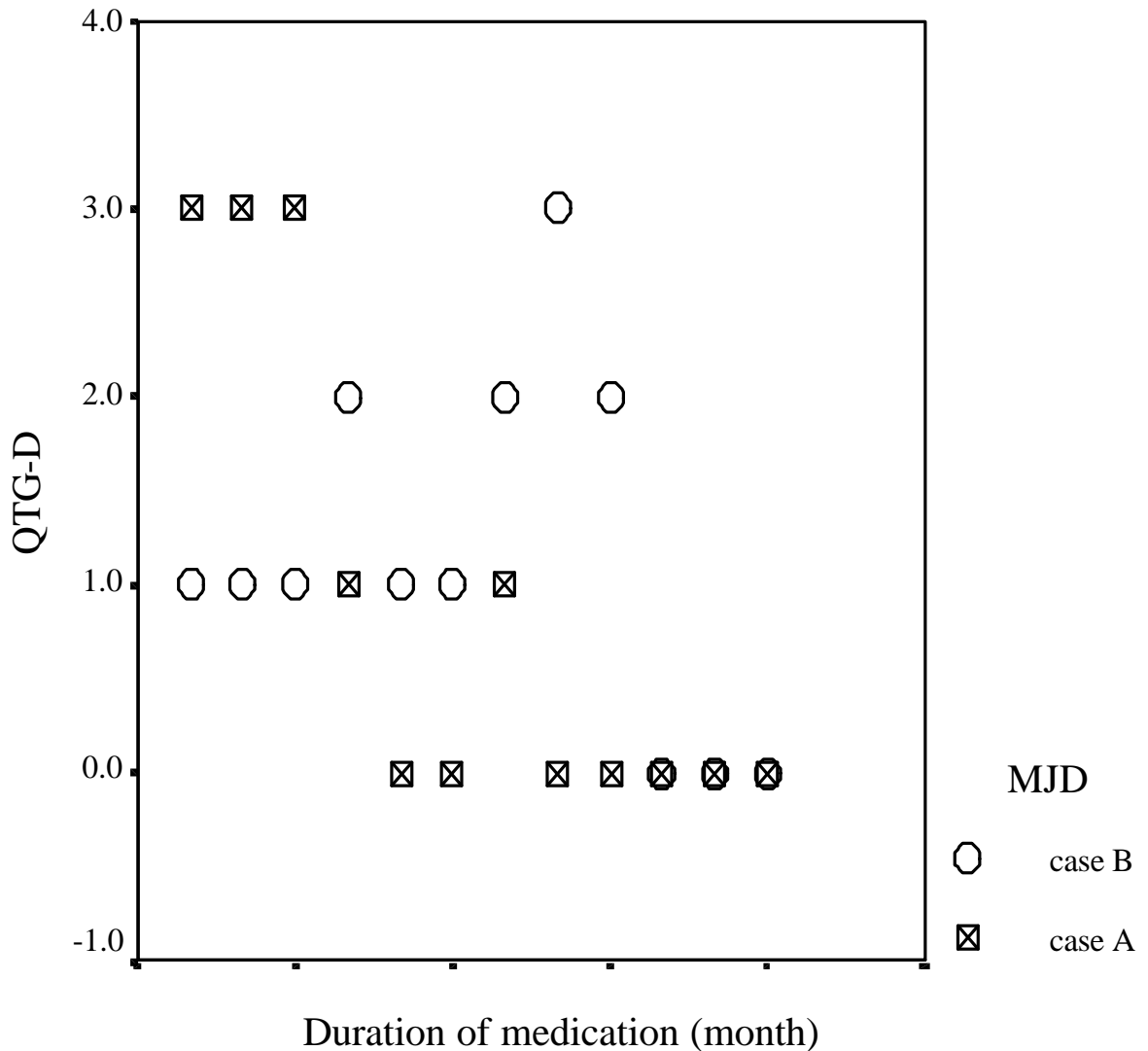
表5 利用 SLST (single leg standing test) 來評估 MJD 病人症狀改善。



S 為開始服用 Lamotrigine 藥物,W 為停止服用 Lamotrigine 藥物。

MJD 病人於服用 Lamotrigine 後，其單腳站立時間會明顯增加，當停止服用 Lamotrigine 後，其單腳站立時間會明顯減少。(劉青山 醫師, 個人資訊)

表 6 利用 QTG-D(qualitative tandem gait timing)來評估 MJD 病人症
狀改善



病人於服用藥物後，以測定其走 50 公尺直線踏到線外次數，來看平衡感。結果病人其踏出次數(QTG-D; qualitative tandem gait timing)會隨著服用藥物時間有顯著進步。(劉青山 醫師, 個人資訊)

表 7 pQE30HA-MJD78 蛋白表現質體的建構

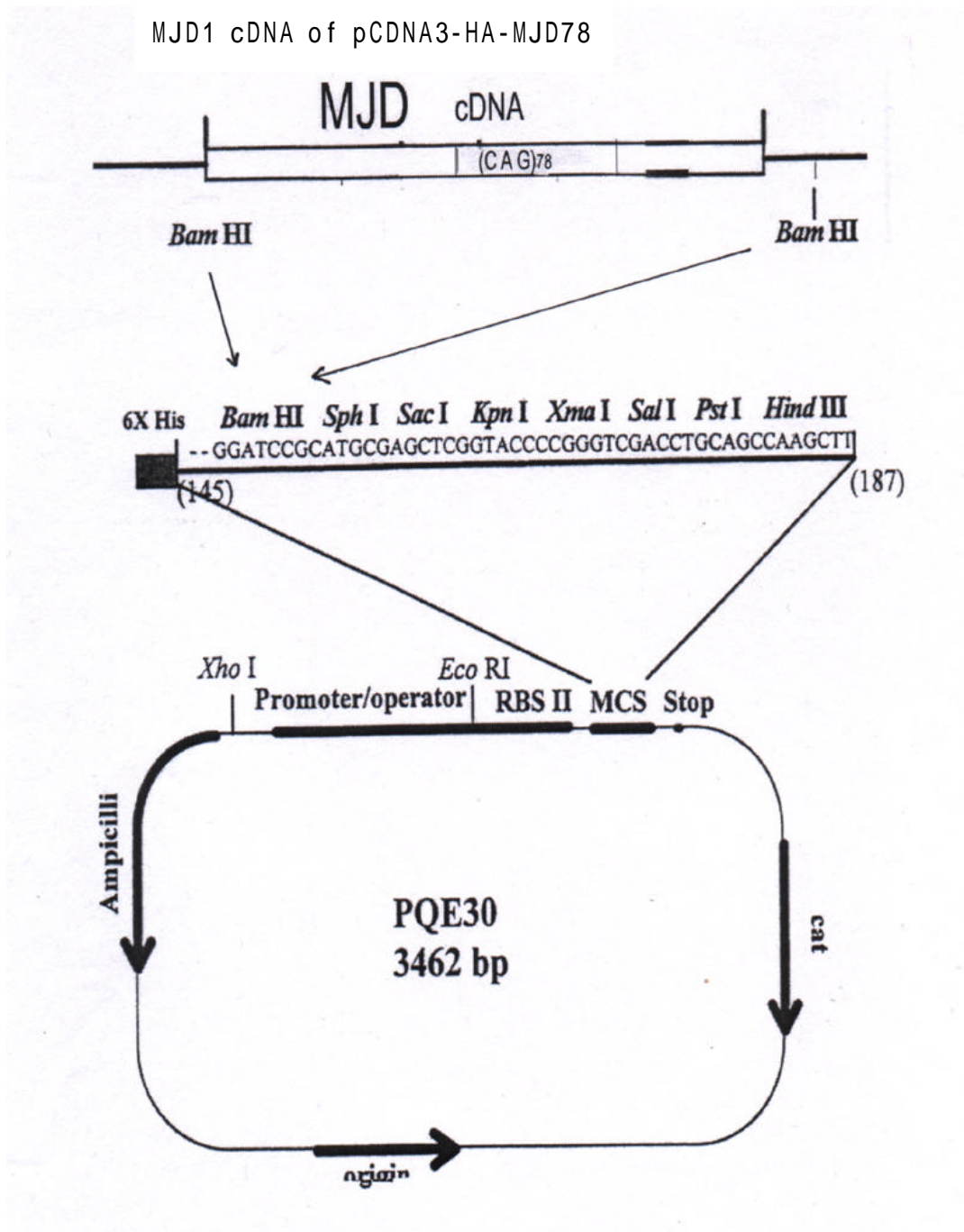


表 8 pQE31-MJD78 蛋白表現質體的建構

MJD1 cDNA of pCDNA3-HA-MJD78

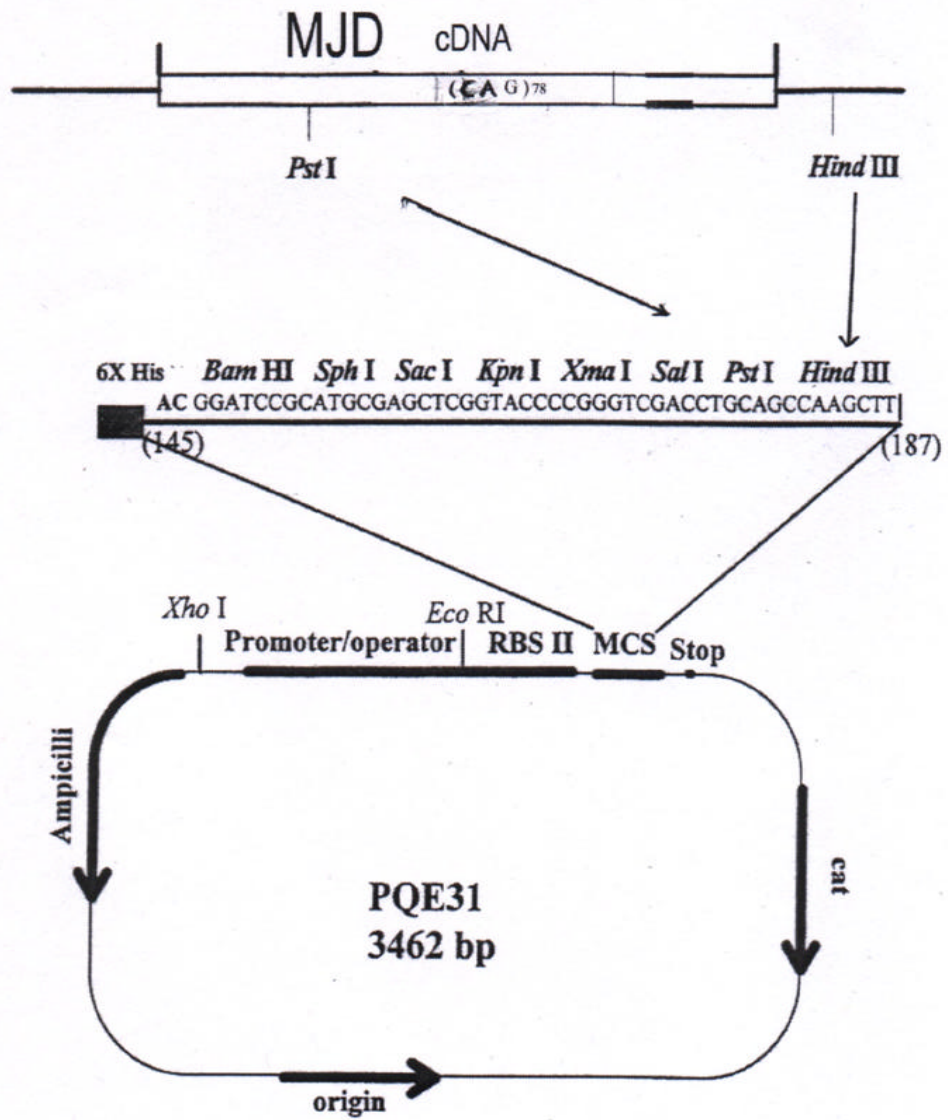
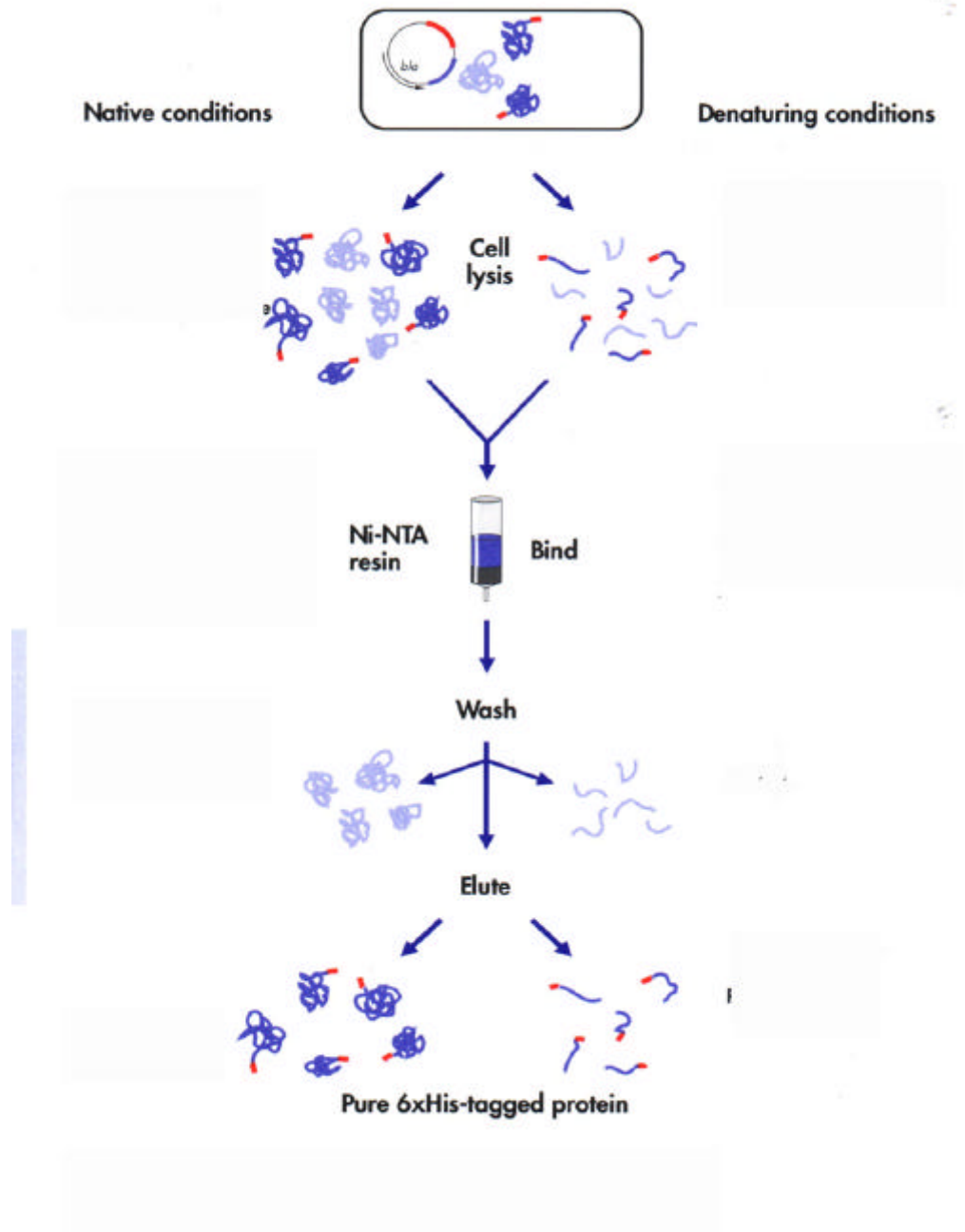


表 9 Ni-NTA 純化抗體示意圖



參考文獻

(Reference)

Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theimann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, Graham RK, and Hayden MR (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genet.*, 4, 398-403.

Alexandra AR, Luisa G., and Figueiredo-Pereira ME (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 21, 516-520.

Lescure A, Lutz Y, Eberhard D and Jacq X (1994) The N-terminal domain of the human TATA-binding protein play a role in transcription form TAT-containing RNA polymerase II and III promoters. *EMBO*, 13, 5, 1166-1175.

Koshy B, Toni M, Burrignt EN, Merry DE, Fischbeck KH, Orr HT, and Zoghbi HY (1996) Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact wiyh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Human Moleclar Genetics*, 5, 9, 1311-1318.

Evert BO, Wullner U, Schulz JB, and Klockgether T (1999) High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vito causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Human Molecular Genetics*, 8, 7, 1169-1176.

McLaughlin BA, Spencer C, and Eberwine J (1996) CAG trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding proteins. *Am. J. Genet*, 59, 561-569

Burrignt EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick L A, Zoghbi HY, and Orr HT (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell.*, 82, 937-948.

Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A., Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, Michele GD, Filla F, Frutos RD, Palau F, Patel OI, Donato SD, Mandel J-L, Coccozza S, Koenig M, and Pandolfo M (1996) Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet RepeatS Expansion. *Science.*, 271, 1423-1427.

Coutinho P, and Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology.*, 28, 703-709.

Christopher JC, and Eyal R (1999) Mutant of the E6-AP ubiquitine reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine induce pathology in SCA1 mice. *Neuron*, 24, 879-892.

Chai Y, Koppenhafer SL, Shoeamith SJ, and Paulson HL (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation *in vitro*. *Human molecular genetics*, 8, 4, 673-682.

- Chai Y, Koppenhafer SL, and Paulson HL (1999) Analysis of the role of heat shock protein molecular chaperones in polyglutamine disease. *The journal of neuroscience*, 19(23), 10338-10347.
- Coutinho P, Calheiros JM, and Andrade C (1977) On a new degenerative disorder of the central nervous system, inherited in an autosomal dominant mode and affecting people of Azorean extraction. *O Medico.*, 82, 446-448.
- David G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giuntill P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, and Brice A (1997) Cloning of the SCA7 gene a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.*, 17, 65-70.
- Davies SW, Beardsall K, Turmaine M, DiFiglia M, Aronin N, and Bates GP (1998) Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions? *Lancet*, 351.131-133.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarinin L, and Bates GP (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90, 537-548.
- Difiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, and Aronin N (1997) Aggregation of Huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science.*, 277, 1990-1993.
- Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Fontali M, and Folstein S (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Gene.*, 4, 387-892.
- Frederic S, Steven Fr, Didier D, and Michael EG (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95, 55-66
- Gilman JT (1995). Lamotrigine: An antiepileptic agent for the treatment of partial seizures. *The Annals of Pharmacotherapy.*, 29, 144-151.
- Giovanni S, Alexandra D, and Alexis B (2000) Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and pathophysiology. *European Journal of Human Genetics*, 8, 4-18.
- Goldberg YP, Nicholson DW, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, and Hayden MR (1996). *Nature Gene.*, 13, 442-449.
- Green H (1993) Human genetic disease due to codon reiteration: Relationship to an evolutionary mechanism. *Cell.*, 74, 955-956.
- Wang G, Ide K, Nukina N and Kanazawa I (1997) Machado-Joseph Disease gene product identified in Lymphocytes and Brain. *Biochemical and biophysical communications*, 233, 476-479.
- Orr HT and Zoghbi HY (2000) Reversing Neurodegeneration: A promise unfolds. *Cell*, 101, 1-4.
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, and Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induce cell death *in vitro* and *in vivo*. *Nature genetics*, 13, 196-202.

- Healton EB, Brust JCM, Kerr DL, Resor S, and Penn A (1980) Presumably Azorean disease in presumably non-Portuguese family. *Neurology*, 30, 1084-1089.
- Holmberg M, Duyckaerts C, Durr A, Cancel G, Gourfinkel-An I, Damier P, Faucheux B, Trottier Y, Hirsch E, Agid Y, and Brice A (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA 7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusion. *Hum. Mol. Genet.* 7, 913-918.
- Hsieh M, Tsai HF, Lu TM, Yang CY, Wu HM, and Li SY (1997), Studies of the CAG repeat in the Machado-Joseph disease gene in Taiwan. *Hum. Genet.*, 100, 155-162.
- Igarashi S, Koide R., Shimohata T, Yamada M., Hayashi Y, Takano H, Date H, Oyake M, Sato T, Sato A, Egawa S, Ikeuchi T, Tanaka H, and Nakano RI (1981).Choline chloride in the treatment of cerebellar and spinocerebellar ataxia. *Journal of the Neurological Science*,50, 161-174.
- Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, and Kakizuka A (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.*, 19,196-201.
- Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D and Trottier Y (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/Glutamine repeats. *Nature Genet.*, 14, 285-291.
- Imbert G, Trottier Y, Beckmann J, and Mandel JL (1994). The gene for the TATA binding protein(TBP) that contains a highly polymorphic protein coding CAG repeat maps to 6q27. *Genomics.*, 21, 667-668.
- Klement IA, Skinner PJ, Zoghbi HY and Orr HT (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation:role in polyglutamine induce disease in SCA1 transgenic Mice. *Cell*, 95, 41-53.
- Jodice C, Malaspina P, Persichetti F, Novelletto A, Spadaro M, Giunti P and Morocutti C (1994) Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 54, 959-965.
- John MW, and Chan HYE (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nature Genetics*, 23, 425-428.
- Kahlem P, Terré C, Green H, and Djian P (1996) Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 14580-14585.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, and Kawakami H (1994). CAG expansions in a novel gene from Machado-Joseph Disease at chromosome 14q32.1. *Nature genet.* 8, 221-227.
- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishiawa A, Hayashi T, Saito M, Tomoda A, Miiike T, Naito H, Ikuta F and Tsuji, S. (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.*, 6, 9-13.
- La Spada AR., Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, and Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.*, 352, 77-79.
- Lunkes A, and Mandel JL (1997). Polyglutamines, nuclear inclusions and

neurodegeneration. *Nature medicine.*, 3, 1201-1202.

Lucio C, and Tiziana de C (1996) Transglutaminase activity is related to CAG repeat length in patient with Huntingtin's disease. *Human Genet*, 98, 633-635.

Macil P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira L, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sundarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LL, LopesCendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer L.A, Sequeiros J. and Rouleau G.A. (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 57, 54-61.

McLaughlin BA, Spencer C, and Eberwine J (1996) CAG trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding protein. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 561-569.

Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Leach H, Davies SW, and Bates GP (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell.*, 87, 493-506.

Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcelo J, O'Hoy K, Leblond S, Jane EM, Pieter JJ, Wieringa B, and Robert GK (1992) Myotonic Dystrophy Mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.*, 255, 1253-1255.

Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishino, T., Sunohara, N., Takahashi, R., Hayashi, M., Nishino, I., Ohtake, T., Oda, T., Nishimura, M., Saida, T., Matsumoto, H., Baba, M., Kawaguchi, Y., Kakizuka, A. and Kawakami, H. (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 807-812.

Mark W. Becher, Joyce A. Kotzuk, Donald L. Price and Christopher A. Ross (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntingtin's disease and dentatorubral and Pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusion and *IT15* CAG triplet repeat length. *Neurobiology of Disease*, 4, 387-397.

Nakano, KK., Dawson, DM and Spence, A (1972) Machado-Joseph Disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurol.*, 22, 49-55.

Ordway, J.M, Tallaksen-Greene S., Gutekunst CA., Bernstein, EM., Cearley JA., Wiener HW, Dure IV, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, and Detloff PJ. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell.*, 91, 753-763.

Parsa Kazemi-Esfarjani and Seymour Benzer (2000) Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, 287, 1837-1840.

Perez MK, Paulson H L, Sonal S, Das BA, Peter BC, and Randall NP (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *The journal of cell biology.* 143, 6, 1457-1470.

Pamela JS, Beena TK, Klement IA and Hartr TO (1997) Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature*, 389, 30, 971-977.

Paul F and Pamela AS (2000) Polyglutamine expansions: Proteolysis, Chaperons, and the danger of promiscuity. *Neuron*, 26, 9-12.

Paulson HL, Sonal SD, Peter BC, Matthew KP, and Randall NP (1997)

- Machado-Joseph Disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *American Neurological Association*. 41, 4, 453-462.
- Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowaki JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, and Fischbeck KH (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron.*, 19, 333-344.
- Perutz M. (1994) Polar zippers: Their role in human disease. *Protein Sci.*, 3, 1629-1637.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunke A, DeJong P, Rouleau G, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, and Sahba S (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.*, 14, 269-291.
- Ranum LPW, Chung M, Banfi S, Bryer A, Schut LJ, Rameser R, and Duvick LA (1994) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. *Am. J. Hum. Genet.*, 55, 244-252.
- Sakai T, Ohta M, Ishino H (1983) Joseph disease in a non-Portuguese family. *Neurology.*, 33, 74-80.
- Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, and Wakisaka A (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nature Genet.*, 14, 277-284.
- Sakai T, Matsuishi T, Yamada S, Komri H, and Iwashita H (1995). Sulfamethoxazole-Trimethoprim double-blind, placebo-controlled crossover trial in Machado-Joseph disease: Sulfamethoxazole-trimethoprim increases cerebrospinal fluid level of biopterin. *J. Neural. Trans-General Section*. 102(2), 159-172.
- Servadio A, Koshy B, Armstrong D, Antalffy B, Orr HT, and Zoghbi HY (1995) Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nature Genet.*, 10, 94-98.
- Li SH and Li XJ (1998) Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Human molecular genetics* 7, 5, 777-782.
- Soong BW, Cheng CH, Liu RS, Shan D (1997). Machado-Joseph Disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Annals of Neurol.*, 41, 446-452.
- Sutherland GR, and Richards RI (1995). Simple tandem repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 3636-3641.
- Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, Endo K, Rogaev EI, Tanaka H, and Sherrington R, (1995) Evidence for intergenerational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 1137-1146.
- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H (1993) The gene for Machado-Joseph disease is mapped to chromosome 14q. *Nature Genet.*, 4, 300-304.
- Tanka K, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, and Tsuji S (1998). Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing

truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genet.* 18,111-117.

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, Saudou F, Weber C, David G, Tora L, Agid Y, Brice A, and Mandel JL (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378, 403-405.

Klockgether T and Evert B (1998) Genes involved in hereditary ataxias. *Cerebellum*, 21, 9, 413-418.

Wang G, Ide K, Nukina N, Goto J, Ichikawa Y, Uchida K, Sakamoto T, and Kanazawa I (1997) Machado-Joseph Disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 233, 476-479.

Warrick JM, Paulson HL, Pittman RN and Bonini NM (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and cause neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93, 939-949.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, Van Omen, GJB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, & Warren ST (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.*, 65, 905-914.

Yamamoto A, Joes JL and Rene H (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington disease. *Cell*, 101, 57-66.

Zhuchenko OB, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns, W B, Subramony SH, Zoghbi HZ & Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.*, 15, 62-69.

楊千瑩 (1997) Machado-Joseph 疾病及第一型小腦脊髓運動失調症的分生研究.(中山醫學院醫學研究所碩士論文)

許秀美 (1998) Machado-Joseph 蛋白之分生研究.(中山醫學院醫學研究所碩士論文)