

R
008.8
0828
87

私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

第一部份：大腸桿菌蛋白 Sigma 54 區域Ⅲ疏水性七
重複區域突變株分析

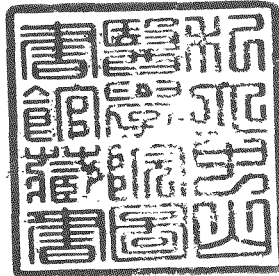
Mutational Analysis of the Hydrophobic Heptad Repeat
in Region III of *E. coli* Protein Sigma 54

第二部分：Machado-Joseph Disease 蛋白之分生研究
Molecular Studies of Machado-Joseph Disease Protein

指導教授：謝明麗 博士 (Mingli Hsieh, Ph.D.)

李娟 博士 (Chuan Li, Ph.D.)

研究生：許秀美 (Hsiu-Mei Hsu)



中華民國八十七年七月

參考書恕不外借

July 1998

中山醫學院圖書館



C050058

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：許香美 聯絡電話：_____

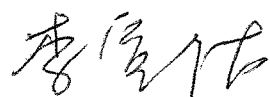
地址：彰化縣田中鎮中州路二段109號

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

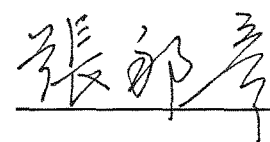
私立中山醫學院生命科學系教授

李宣佑 博士



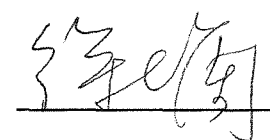
國立中興大學遺傳中心副教授

張邦彥 博士



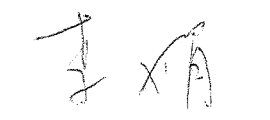
台中榮總教學研究部副研究員

徐士蘭 博士



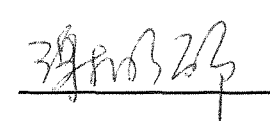
私立中山醫學院醫學研究所副教授
(論文指導教授)

李娟 博士



私立中山醫學院醫學研究所副教授
(論文指導教授)

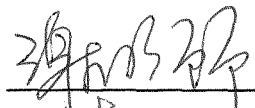
謝明麗 博士



中華民國八十七年七月

學生許秀美論文題目為(1)大腸桿菌蛋白 Sigma 54 區域III
疏水性七重複區域突變株分析(2)Machado-Joseph Disease
蛋白之分生研究，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士
論文考試委員會審合格及口試通過，並尤其指導教授核閱
後無誤。

指導教授：謝明麗 博士

簽名：

指導教授：李 娟 博士

簽名：

中華民國 87 年 7 月

致謝

感謝我的指導教授謝明麗老師與李娟老師，在學業上及實驗上的指導與教誨，使原本對分子生物一竅不通的我能在短短的兩年的時間內，完成這本論文。非常感謝中興大學遺傳中心張邦彥教授、台中榮總徐士蘭教授與本校生命科學系李宣佑教授在百忙之中對本論文的審閱與建議使論文更趨完善。同時要感謝李宣佑教授、陳凌雲教授與蕭光明副教授在實驗設備與實驗技術的支援，謝謝蔡姐協助建立淋巴母細胞的培養與也謝謝細胞遺傳室的所有工作者的協助。此外，要感謝台中光田醫院的劉青山醫師的協助，提供檢體與藥品以及研究上的建議與討論。在研究所的同學們惠敏、孟琴、三立、碧雲姐、文通與嘉仁，很高興能與你們在醫研所相處兩年，尤其是惠敏，經常為我分憂解勞。實驗室的可愛的佳慧、美麗的和茂與大學部的學弟妹，逸芸、如珊、俊強、純毓、文琦、怡欣、仕奇、澤峰、逢辰、宗遙、雨純與欣蘭，謝謝你(妳)們在實驗上的幫忙。

另外謝謝千瑩學姊與孫小毛(翠蓮)在一年級時對我的照顧，讓我住宿在外仍有家的感覺。同時更要謝謝我的好友剛瑋、秀仁與元衍在二年級時給予實驗上與生活上的相互支持與照顧，以及好朋友耀聰與志銘在這兩年對我的關心與鼓勵。

最重要的是要感謝我的父母親與家人，雖然我很少在家中陪伴你們，但是謝謝你們給我最大的支持與鼓勵。最後謹以本篇論文獻給我的家人與所有關心我的朋友們。

民國 87 年 7 月

目錄

第一部份：大腸桿菌蛋白 Sigma 54 區域Ⅲ疏水性七重 複區域突變株分析

中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
序論.....	6
材料與方法.....	11
結果.....	16
討論.....	22
參考文獻.....	25
圖表.....	28

第二部分：Machado-Joseph Disease 蛋白之分生研究

中文摘要.....	41
英文摘要.....	42
序論.....	44
材料與方法.....	49
結果.....	55
討論.....	59
參考文獻.....	63
圖表.....	72
附錄一：試藥.....	83



第一部份

大腸桿菌蛋白 Sigma 54 區域Ⅲ疏水性七重複 區域突變株分析

Mutational Analysis of the Hydrophobic Heptad
Repeat in Region III of *E. coli* Protein Sigma 54

中文摘要

Sigma 54 是細菌體內一種次要的轉錄因子，與主要的轉錄因子 sigma 70 不同，但是其轉錄機制與真核生物的 RNA 聚合酶 II 所主導轉錄機制很像，包括都需要 ATP 的水解，才能促使雙股 DNA 的分離；都需要活化子才能促進轉錄的起始；與 RNA 聚合酶 II 轉錄因子相似的特色結構。先前研究將 sigma 54 的 N 端白胺酸七重複區域與區域 III 中疏水性七重複截斷，會影響 sigma 54 在 *glnAp2* 啟動子-12 區域的結合。經由點突變證實在區域 I 疏水性七重複是辨認啟動子-12 區域及轉錄活化的重要位置。為了分析 sigma 54 區域 III 疏水性-酸性區域上疏水性殘基對轉錄的影響，我們將區域 III 疏水性七重複區域利用點突變將白胺酸或異白胺酸改變為親水性絲胺酸，建立一系列單點突變、雙點突變及三點突變，並進而以硫酸二甲基足跡法(DMS footprinting)，高錳酸鉀足跡法(permanganate footprinting)，核心酶結合測試(core-binding assay)及 mRNA 產量分析(transcription assay)的方法來分析突變的 sigma 54 對轉錄的影響。

由高錳酸鉀足跡法結果顯示在單點突變及雙點突變的 sigma 54，並不會影響啟動子和 RNA 聚合酶複合體之張開式複合體的形成，而在三點突變 sigma 54 幾乎完全被破壞，而無法形成張開式複合體。由硫酸二甲基足跡法的結果顯示雙點突變 sigma 54 只有少部分結合到 *glnAp2* 啟動子-12 區域上，而三點突變 sigma 54 幾乎不能結合到-12 區域。另外，在雙點突變 sigma 54 轉錄製造 mRNA 的能力下降至原型 sigma 54 之 30 %至 40 %，三點突變 sigma 54 則下降

至原型之 20 % 或小於 10 %。在 sigma 54 與核心酵素結合能力分析中，發現雙點突變 sigma 54 與核心酵素結合能力下降，三點突變 sigma 54 與核心酵素結合能力完全喪失。由以上的結果，顯示此區域上疏水性胺基酸的破壞將破壞 sigma 54 和核心酶的結合能力，進而導致與啟動子-12 區域的辨認對轉錄起始作用的下降。因此，本實驗證實了 sigma 54 區域 III 疏水性七重複區域的疏水性殘基是核心酶結合的重要的區域。

英文摘要

(Abstract)

Escherichia coli transcription factor sigma 54 contains motifs that resemble closely those used for RNA polymerase II in mammalian cells, including two hydrophobic heptad repeats, a very acidic region and a glutamine-rich region. Previous deletion studies suggested that the leucine heptad repeats in the N-terminal region may work together with the hydrophobic repeats in the Region III to contribute on the promoter recognition on -12 region. It was demonstrated through site-directed mutagenesis study that hydrophobic residues on the heptad repeats in Region I are necessary for -12 promoter element recognition and transcription activation. In order to specify the roles of hydrophobic residues in Region III, we performed site-directed mutagenesis to create mutations in the leucines or isoleucines on the hydrophobic heptad repeats. A series of mutants with single, double and triple mutations have been created and characterized by the use of in vivo permanganate footprinting, dimethyl sulfate (DMS) footprinting, core binding and transcription assays.

The results of permanganate footprinting indicated that single- or double-amino-acid substitutions showed no discernible loss of transcription start opening. Nevertheless, the two triple mutants almost abolished the transcription start site opening. On the other hand, double

mutants showed only partial abilities to bind core RNA polymerase and partial protection on the -12 promoter element of *glnAp2* promoter. The triple mutants lost most, if not all, of their ability to protect the -12 promoter element in the DMS in vivo assays, and their ability to bind core RNA polymerase. In addition, double mutations are deleterious to the function of sigma 54, indicated by retaining only 30%-40% of the wild type mRNA level. Two triple mutants produced about 20% or less than 10% of the wild type transcripts in the *glnAp2* promoter. Our results suggest that the hydrophobic residues of the heptad repeats of Region III are important for the function of core RNA polymerase binding. Here we conclude that a progressive loss of the hydrophobicity on the hydrophobic heptad repeats in Region III of sigma 54 result in a progressive loss of core-binding ability, recognition of the -12 promoter element and mRNA production.

序論

(Introduction)

原核生物轉錄的研究，一開始是來自於大腸桿菌的研究。大腸桿菌的 RNA 聚合酶由 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 等次單位組成稱為全酵素 (holoenzyme)。當 RNA 合成開始後， σ 次單位自全酵素中解離出來，缺少 σ 次單位的 RNA 聚合酶稱為核心酶 (core enzyme)。原核生物中參與轉錄的 σ 因子主要分成兩類：第一類是屬於像 σ^{70} 家族的 σ 因子，可以辨認啟動子上 -35 區域和 -10 區域。第二類是屬於像 σ^{54} 的 σ 因子，不同於其他的 σ^{70} 家族中的因子， σ^{54} 可以辨認啟動子上 -24 區域和 -12 區域 (Gralla, 1991)。在大腸桿菌中 σ^{70} 是一種最重要的 σ 因子，主要維持大腸桿菌正常狀態下生理功能。而其他的 σ 因子是為了讓細菌適應特殊環境的 σ 因子，例如 σ^{32} 是與啟動 heat shock 基因有關的 σ 因子， σ^{54} 是與氮源調控有關的 σ 因子 (Hirschman et al., 1985)。

σ^{54} 是第一個被發現與氮源調控有關的 σ 因子 (Hirschman et al., 1985)。要了解氮源調控的機制，就必須談到 *glnALG* 操縱子(圖 1)。*glnA* 是 glutamine synthetase 的結構基因，*glnL* (*NtrB*) 是 NR_{II} 的結構基因，*glnG* (*NtrC*) 是 NR_I 的結構基因。*glnALG* 操縱子有三個啟動子，*glnAp1*、*glnAp2* 和 *glnLp*，其中 *glnAp1* 的啟動子是在氮源充足情況下(高於 1 mM) (Magasanik, B., 1988)，維持細胞內低濃度的 glutamine synthetase。*glnAp2* 的啟動，則需要 σ^{54} ，而且它的啟動是在氮源不足時(低於 0.1 mM)才會發生，目的是維持細胞內高濃度的

glutamine synthetase 和 $NR_I/NtrC$ 。 $glnLp$ 的啟動，目的在於維持細胞內低濃度的 $NR_I/NtrC$ 和 $NR_{II}/NtrB$ (Magasanik, B., 1988)。在氮源不足時，細胞內的 glutamine/ β -ketoglutarate 比值會變低，這樣就會促使 P_{II} ($glnD$ 的產物)經由 uridylyltransferase (Utase)作用變成 P_{II} -UMP，在 free P_{II} 降低下， $NR_{II}/NtrB$ 就可以把 $NR_I/NtrC$ 磷酸化，磷酸化的 $NR_I/NtrC$ 就可啟動 $glnAp2$ 。反之，當氮源充足時，glutamine/ β -ketoglutarate 比值會變高，uridylyl-removing enzyme 就會把 P_{II} -UMP 的 uridylyl-group 除去而變成 free P_{II} ， P_{II} 導致 $NR_{II}/NtrB$ 又會把磷酸化的 $NR_I/NtrC$ 去磷酸化，而抑制 $glnAp2$ 的轉錄(圖 2) (Magasanik, B., 1988)。 $glnAp2$ 是第一個被發現把它上游的調控基因 (regulatory elements)移到轉錄起點的上游或下游超過一千個鹼基對之外，仍具有功能的 σ^{54} -dependent 啟動子 (Reitzer and Magasanik, 1986)，也就是說這些調控因子，即 $NR_I/NtrC$ 的結合位置，具有像真核增進子 (enhancer) 的特色 (Nifa and Magasanik, 1986；Hirschman et al., 1985)。

原核生物中仰賴 σ^{54} 啟動子的表達系統和真核生物中的 RNA 聚合酶 II 表達系統有相類似之處，但較真核生物轉錄系統簡單，因為原核生物轉錄系統中只包含三種蛋白質的參與，包括：核心酶、 σ^{54} 、及活化子(例如 $NR_I/NtrC$)。 σ^{54} -dependent 轉錄機制具有很多與真核生物中的 RNA 聚合酶 II 轉錄機制相似處。這些轉錄啟動子相似處：(1)活化子結合位置通常位於轉錄起始點的上游，類似增進子(enhancer)。(2)需要 ATP 幫助轉錄的起始，因為 ATP 水解使得 σ^{54} -dependent 啟動子形成張開式複合體。(3)蛋白結構上的相似性，

發現這些保守區域有一些特色結構與真核的聚合酶 II 轉錄因子很像 (Sasse-Dwight and Gralla, 1990)，包括 glutamine-rich domain、兩個疏水性七重複區域及強酸性區域，這些共同的特性是 σ^{70} -dependent 系統中所沒有的 (Popham et al., 1989)。

σ^{54} 需要活化子(activator) (例如 NtrC) 才能進行轉錄，而且這些活化子的結合位置即使移到轉錄起點的上游大於 200 bp 之外仍具有活化轉錄的功能，與真核生物的強化子(enhancer)的機制類似 (Reitzer and Magsanik, 1986；Magasanik, 1993)。現在研究得知，在轉錄起始點上游 NR_I/NtrC 磷酸化會和全酵素(holoenzyme)結合，形成 DNA looping 機制(圖 3)(Su et al., 1990； Reitzer et al., 1989)。 σ^{54} RNA 聚合酶在 ATP 存在反應下，磷酸化的 NR_I/NtrC 水解 ATP，使 DNA 雙股被催化打開形成張開式複合體(open complex)，而開始轉錄起始的進行 (Weiss et al., 1991)。

σ^{54} 的胺基酸序列已被定序出來，發現具有三種保守區域 (conserved region) 分別是區域 I、II 和 III (圖 4) (Merick and Gibbins, 1985；Merick et al., 1987；Ronson et al., 1987)。而且發現這些保守區域有一些特色結構與真核的聚合酶 II 系統中的轉錄因子很像 (Sasse-Dwight and Gralla, 1990)，包括 glutamine-rich domain、兩個疏水性七重複區域及強酸性區域。在最近對於 σ^{54} 蛋白質做不同的點突變研究，發現 σ^{54} 上區域 I 上的 leucine-rich motif 與 *glnAp2* promoter 上 -12 保守區域的結合有關 (Hsieh et al., 1994；Tintut et al., 1994；Wong et al., 1994)。區域 II 上部分酸性區域(胺基酸 51-77)截

斷，發現區域II酸性區域與DNA雙股分離有關，但 σ^{54} 辨認*glnAp2*啟動子上-12區域及-24區域的能力不受影響(Wong et al., 1994)。區域III上一段次區域被認為是RNA核心聚合酶的結合位置(Tintut et al., 1994; Wong et al., 1994)。此外， σ^{54} 的螺旋-轉彎-螺旋(Helix-turn-Helix)特色結構主導全酶結合到*glnAp2*啟動子-24區域是已被證實的(Guo and Gralla, 1997)，最近研究進一步顯示 σ^{54} 對DNA結合位置包含兩個區域，分別是C-端DNA結合區域(C-terminal DNA binding domain)，此區域(胺基酸329-447)直接接觸DNA上，另一區域是增強DNA結合的區域，此區域(胺基酸180-306)位於C-端DNA結合區域前，可以增進 σ^{54} 結合到DNA結合活化區域(Cannon et al., 1997)。

由於在疏水性七重複區域分別見於區域I及區域III，Leucine-rich區域可能形成 α -螺旋結構(α -helix)，區域III的Leucine疏水性七重複區域是否在增進子型轉錄作用機制上也扮演特定的角色，是我們想了解的。早期實驗中將區域I中的胺基酸18-31截斷(deletion)(突變Sal I)，破壞疏水性七重複區域，發現這個突變Sal I喪失對*glnAp2*啟動子上-12區域的結合，因而無法將轉錄起始點上雙股DNA分離形成單股DNA(DNA melting)。推測區域I上疏水性七重複區域與*glnAp2*啟動子上-12區域的結合有關(Sasse-Dwight and Gralla, 1990)。由於 σ^{54} 的N端區域的氨基酸由Leucines及Glutamines組成的氨基酸佔40%，所以N-端Glutamine殘基經由點突變研究發現glutamine與轉錄起始點雙股DNA分離成單股DNA(DNA melting)有關(Hsieh et al., 1994)。隨後，對於N端的Leucine疏水

性七重複特色結構的研究中，將 Leucine 或 Isoleucine 做一系列的點突變，證實 Leucine 疏水性七重複特色結構區域和正確辨認 *glnAp2* 啟動子上-12 區域以及引導全酵素結合到啟動子上有關 (Hsieh and Gralla., 1994)。另一方面的研究則發現，將位於第 25 至 31 胺基酸上的多於 2 個 Leucines 同時做點突變，顯示出在缺乏活化子 NtrC 及 ATP 時，仍然可以進行轉錄 (Wang et al., 1995 ; Syed and Gralla, 1997)。

先前的研究已知，破壞位於區域 III 中酸性-疏水性七重複胺基酸上多數的酸性胺基酸或多數疏水性胺基酸，會嚴重降低 σ^{54} 和核心酶結合的能力 (Tintut et al., 1994)。區域 III 上疏水性-酸性區域上的多點突變 (LHS-3, RHS-3) 或單點截斷 (del L179)，在核心酶結合測試(core-binding assay)中，均證實失去了與核心酶的結合，但是單點突變(LS179)將 leucine 改變為 serine，並不會影響與核心酶結合的能力(Tintut et al., 1994)。隨後，經由 PCR 進行任意點突變發現， σ^{54} 區域 III 上疏水性-酸性區域上胺基酸 175-180 是核心酶結合的重要片段(Tintut and Gralla, 1995)。然而區域 III 疏水性七重複特色結構上是否和核心酶的結合有直接關係仍有待釐清。因此我們實驗室之前已將區域 III 疏水性七重複上的 Leucines 或 Isoleucines 以定點突變方法改為親水性的 Serine (圖 5)，現今利用活體實驗(in vivo)硫酸二甲基足跡法(DMS footprinting)、高錳酸鉀足跡法(permanganate footprinting)、mRNA 產量分析(transcription assay)及核心酵素結合分析(core-binding)的方法，來觀察點突變、雙點突變或參點突變的 σ^{54} 對轉錄起始作用的影響。

材料與方法

(Materials and Methods)

1. W-Arginine X-gal plate test

由於 YMC109^{tk} 的染色體上含有兩個 *glnAp2* 啟動子，其中一個為外插入的 *glnAp2* 啟動子後接 *lacZ* 基因，在低氮源的基礎培養基中，具有功能的 σ^{54} 才能啟動 *glnAp2* 表現 *lacZ* 基因，產生 β -Galactosidase 分解 X-gal，產生藍色的菌落。假使 σ^{54} 轉錄功能有缺陷，就會影響到 *lacZ* 基因的表現，所以就可以從 W-Arginine X-gal plate 上菌落顏色的情形，初步判斷 σ^{54} 突變型對轉錄的影響程度。W-Arginine X-gal plate 含有 arginine 0.01 mg/ml 和 X-gal 40 μ g/ml 以及適當的抗生素 (kanamycin 40 μ g/ml、tetracyclin 15 μ g/ml 和 ampicillin 100 μ g/ml)。W-Arginine plates 中的 W-salts media (60 mM K_2HPO_4 ，33 mM KH_2PO_4 ，0.43 mM $MgSO_4$) 是一種不含氮的基礎培養基 (Reitzer and Magasanik, 1985)，將轉形後的細菌在 LB plates 經過 37°C 一個晚上培養，長出菌落後，用 loop 把菌株劃在 W-arginine X-gal plates 上，經過培養 37°C 一個晚上，觀察其生長狀態。

2. 高錳酸鉀足跡法($KMnO_4$ footprinting):

為了啟動 σ^{54} -dependent *glnAp2* 啟動子，用 G-Gln media (W-salts 10 ml，20 % glucose 200 μ l，4 % L-glutamine 500 μ l，10 mg/ml thiamine 20 μ l) 來培養細菌，G-Gln media 是一種低氮源的培養液，

當含 σ^{54} 的 YMC109^{tk} 的 10 ml 菌液生長到 A_{600} 為 0.35-0.5 的時候，加入最終濃度 0.5 mM IPTG 啟動 *rpoN* 基因，培養 45 分鐘，誘導 σ^{54} 的大量表現，然後加入 40 μ l 的 rifampicin (50 mg/ml) 培養 5 分鐘後，再加入 270 μ l 的 0.37M $KMnO_4$ 培養 2 分鐘。離心把細胞收集起來，溶於 1 ml SE (150 mM NaCl, 100 mM EDTA)，再離心把細胞收集起來；再加入 480 μ l SET (150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl pH8.0) 和 5 μ l RNaseA (10 mg/ml) 以及 50 μ l 的 10 % SDS，把細胞打破，37°C 水浴 15-20 分鐘，再加入 5 μ l Proteinase K (10 mg/ml)，37-50°C 水浴一個晚上；然後用酚和氯仿純化 DNA，isopropanol 沉澱 DNA，DNA 通過 G50-80 Sephadex 的管柱，使 DNA 更乾淨。以等量的 DNA 進行 PCR，PCR 的條件為定量 DNA 加入 10 倍 buffer 10 μ l，5mM dNTP 4 μ l，³²P 標定的 GlnD 引子(GlnD 引子序列為 5'-GGTCATGGTCGTCGTGG-3') 位於 *glnAp2* “+60” 位置，DNA 聚合酵素 1 μ l，適量的水至總體積 100 μ l。

PCR 熱周期條件為: 94°C 1 分鐘 30 秒，57°C 2 分鐘，72°C 3 分鐘，1 cycle；94°C 1 分鐘，57°C 2 分鐘，72°C 3 分鐘，13 cycle；94°C 1 分鐘，57°C 2 分鐘，72°C 10 分鐘，1 cycle。

PCR 的產物以等量的氯仿萃取一次，加入 1/3 體積的 3 M NaOAc，再以絕對酒精沉澱 DNA，最後加入 loading dye，進行電泳分析於 6 % sequencing gel，以 X 光片壓片，然後分析結果。

3. 硫酸二甲基足跡法(DMS footprinting)的材料和方法:

硫酸二甲基足跡法與高錳酸鉀足跡法的方法大致類似，不同處是在 0.5 mM IPTG 培養後，必須加入 2.83 μ l 的 10.6 M 硫酸二甲基培養 5 分鐘，以及在通過 G50-80 Sephadex 管柱前，必須先加入 100 μ l 的 1 M 一氮六圓(piperidine)，90°C 水浴 30 分鐘。

4. mRNA 產量分析法:

mRNA 產量分析實驗設計取 total RNA，然後用 glutamine synthetase 基因上的一段 DNA 序列 GlnD 引子 (GlnD 引子序列為 5'-GGTCATGGTCGTCGTGG-3') 作反轉錄的 primer extension (Baga et al., 1988)，同時也用 β -lactamase 基因上一段 DNA 序列，即 Bla1 引子 (Bla1 引子序列為 5'-CCAACTGATCTTCAGCATC-3') 作為 internal control，來看這些突變型 σ^{54} 對 *glnAp2*-specific mRNA (也就是 glutamine synthetase mRNA) 轉錄的影響。

mRNA 產量分析法是含 σ^{54} 的 YMC109^{tk} 的 10 ml 菌液在 G-Gln media 中生長到 A_{600} 為 0.35-0.5 的時候，加入最終濃度 0.5 mM IPTG 誘導 45 分鐘後，用 350 μ l SA (0.15 M sucrose, 0.01 M sodium acetate) 把細菌打散，然後加入 65°C 350 μ l 的 2% SDS/SA，再加入 70 μ l 2 M sodium acetate、100 μ l chloroform/isoamylalcohol (24:1)、350 μ l acidic phenol，混合均勻，冰浴 15 分鐘，離心 12000 rpm 20 分鐘，然後用異丙醇或酒精沉澱 RNA 兩次，取定量 RNA 作反轉錄實驗 (reverse transcription)。

反轉錄實驗是取 20 μ g 的 RNA 加入 5 mM dNTP 2 μ l，5 倍 RT

buffer (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT) 3 μ l, ³²P 標記的 GlnD 引子適量, ³²P 標記的 Bla I 引子適量, 反轉錄酶(reverse transcriptase) 1 unit, 加適量水至 30 μ l, 42°C 水浴至少 45 分鐘, 加 20 μ l loading dye, 然後進行電泳分析於 6 % sequencing gel。把 gel 乾燥後, 以 X 光片壓片, 然後再分析結果。

5. σ^{54} 與核心酵素結合分析

(1) 細菌蛋白質的全萃取液(Total protein extract):

當含 σ^{54} 的 YMC109^{tk} 菌液在 10 ml LB(Luria-Bertani)培養液中生長至 A₆₀₀ 為 0.5 的時候, 加入最後濃度為 0.5 mM IPTG 來啟動 *rpoN* 基因大量表達, 培養 60 分鐘, 誘導 σ^{54} 的大量表現, 離心收下菌體放置 4°C 冰上 10 分鐘, 加入 1 ml buffer B (10 mM Tris pH8.0; 50 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 95 % Glycerol)清洗培養液, 離心後再加入 0.1 ml buffer B 溶解菌體, 超音波破膜機震盪 30 秒, 至於冰水上 1 分鐘, 重複 3 次。加入 1 μ l 的 100 mM DTT, 在 4°C 下 12000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液, 保存於含 40 % glycerol, -20°C。

(2) 探針(probe)的製備

我們使用含有 Biotin 標記, 攜帶從-45 到+10 的 *Rm nifH* 啟動子序列的 55 base-pair 片段做為探針。Biotin 標記的引子 nifA (5'-AGTTT TATTT CAGAC GGCTG GCACG ACTTT TGCAC GA-3') 與 Biotin 標記的引子 nifB (5'-ATGCG CGCCC AGGGC TGATC GTGCA AAAGT CGTGC CA-3') 為 19 個 bases 互相重疊的引子。製造此 55bp

的探針方法簡述於下:引子 nifA 與引子 nifB 和 10 倍 hybridization buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 混合均勻後, 在 37°C 下水浴作用 1 小時。放置於室溫下 30 分鐘至 1 小時, 再加入 3 個單位的 T4 DNA 聚合酶(T4 DNA polymerase)與 33 μM dNTP, 於室溫下作用 1 小時, 最後探針(probe)的濃度為 3 pmol/μl, 完成後保存於-20°C。

(3) Gel mobility shift assay:

5 倍 binding buffer (200 mM Hepes pH 8.0; 50 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 5 mM DTT; 0.5 mM EDTA; 0.5 mg/ml BSA; 25 % glycerol) 與 0.01 μg poly d(I:C)、0.1 mM ATP、3.5 % PEG6000 混合後加入 1 μl 菌體蛋白質的全萃取液(Total protein extract), 在 30°C 下水浴作用 30 分鐘。加入 1 μl 探針(probe)後, 跑 5 % 的 native gel, 400 伏特。當染料 XC 跑到最下層的位置, 則將膠體上的 DNA-蛋白質利用電流轉漬到 NC-paper (nitrocellulose paper)上(100 伏特, 60 分鐘)。轉漬後的 blot 以 UV 254 nm cross-linking 3 分鐘, 加入 5 % 低脂牛奶溫和搖晃 30 分鐘, 再加入 Streptavidine-HRP(Pierce)溫和搖晃 20 分鐘, TBS 清洗 3 次, 然後加入 1:1 的 Working solution (Luminol/Enhancer solution: stable peroxide solution; Pierce), 於室溫下搖晃 3 分鐘, 倒掉 working solution, 將 bolt 置於 X 光片下曝光, 曝光時間依 signal 強弱而定。

結果

(Result)

1. Plating test :

此實驗目的可測試突變 σ^{54} 基因的轉錄能力。利用 plating test 分析區域 III 突變 σ^{54} 的轉錄能力，當細菌中缺乏具功能 σ^{54} 蛋白時，在低氮源的培養基中，則無法產生藍色菌落。區域 III 突變 σ^{54} 的 plating test 結果顯示(表 1)，可看到在區域 III 七重覆的單一定點突變 IS 165、IS 172 和 LS 179，與原型 pTH7 比較，其顏色並無變化，表示 σ^{54} 在區域 III 七重覆的單一定點突變對轉錄作用無明顯影響。區域 III 七重覆上的雙點突變 LS 158/165、IS 165/172 和 IS 172/179 與原型 pTH7 比較，其顏色較淡，表示雙點突變會降低 σ^{54} 上 *glnAp2* 的啟動表達。

在區域 III 的 LHS-3 和 RHS-3 兩個參點突變與原型 pTH7 比較，顯現相當淡的藍色或無色，表示多重點突變明顯降低 σ^{54} 轉錄能力，和先前發表結果相同 (Tintut et al., 1994)。而 plating test 只是初步定性的實驗，我們需要進行定量 mRNA 產量分析來進一步研究。

2. mRNA 產量分析結果：

由細菌中分離出 RNA，利用引子延展(primer extension) 實驗方法分析，突變型 σ^{54} 全酶對 *glnAp2* mRNA (即 glutamine synthetase mRNA)轉錄的影響，結果顯示所有突變的 σ^{54} 全酶均可以自起始轉

錄點處進行轉錄(圖 6)。引子 Gln D 可以雜交(hybridized)到 glutamine synthetase 轉錄上的一段序列，由於其轉錄受 σ^{54} 控制，可用來測量突變型 σ^{54} 對 *glnAp2* 轉錄的影響，而引子 Bla1 雜交到 β -lactamase 轉錄上，其轉錄受 σ^{70} 全酵素所控制，因此可做為 internal control。Lane 1 是原型 σ^{54} ，lane 2 至 lane 4 是單點突變 IS165、IS172 和 LS179，lane 5 至 lane 7 分別是雙點突變 IS158/165、IS165/172 和 IS172/179，lane 8 至 lane 9 是參點突變 LHS-3 及 RHS-3，lane 10 是不含 σ^{54} 的宿主細胞。區域 III 突變 σ^{54} 全酶控制的 *glnAp2* 轉錄的含量經過 β -lactamase 表達量的校正後和原型 pTH7 相互比較(表二)。分析 mRNA 產量結果的數據和初步的 plate test 相符合，區域 III 七重覆單點突變 σ^{54} 的 *glnAp2* 轉錄含量和於原型 σ^{54} 轉錄含量幾乎相同，雙點突變 σ^{54} 的 mRNA 轉錄含量為原型 σ^{54} 轉錄含量的 30-40% 左右，和 plating test 結果相似。另一方面，在參點突變 LHS-3 和 RHS-3 的 mRNA 含量為原型 σ^{54} 轉錄含量的 20% 或更少於 10%。由以上結果顯示多點 leucine 或 isoleucine 突變使得 σ^{54} 聚合酶在 *glnAp2* 啟動子上轉錄的進行受阻。

3. In vivo 中張開式複合體的形成：

高錳酸鉀足跡法可用來測出突變型 σ^{54} 對張開式複合體形成的影響 (Sasse-Dwight and Gralla, 1988)。高錳酸鉀是一種很強的氧化劑，因此容易與轉錄或複製過程中的單股 DNA 起反應，高錳酸鉀與 DNA 四個鹽基的反應性大小依序是 T、C、G、A，所以高錳酸

鉀主要是攻擊單股 DNA 上的 Thymine 環上的 5,6 雙鍵；因此，如果單股 DNA 愈多，則其上的 Thymine 被攻擊的也愈多，如此便能利用 primer extension 的方法來測量張開式複合體形成的量。在轉錄或複製過程中張開式複合體形成後很快的進入延長(elongation)步驟，在短暫的時間使得高錳酸鉀無法有效發揮。因此需要用轉錄延長抑制劑 rifampicin 將轉錄停在張開式複合體，而不會進入延長的步驟。

轉錄能力的降低可能是因為突變型 σ^{54} 對啟動子的辨認改變或是造成雙股分離的能力改變。因此我們利用 KMnO_4 足跡法分析 DNA 雙股分離能力。 σ^{54} 聚合酶可以幫助 *glnAp2* 啟動子被活化啟動，在轉錄起始點上的雙股 DNA 分離形成張開式複合體 (Sasse-Dwight and Gralla, 1988; Popham et al., 1988)。先前研究已曾利用 KMnO_4 足跡法分析原型 σ^{54} 全酶及截斷突變型 σ^{54} 全酶在 *glnAp2* 啟動子上轉錄起始時雙股 DNA 的分離 (Sasse-Dwight and Gralla, 1988; Wong and Gralla, 1992)。我們也運用相同的實驗系統來分析區域 III leucine 或 isoleucine 突變型 σ^{54} 。區域 III 七重覆疏水性殘基的 σ^{54} 突變，仍在轉錄起始點上 +1 到 -3 的位置進行雙股 DNA 的分離，因此，我們可經由高錳酸鉀足跡法分析其形成張開式複合體的產量。

由(圖 7)所示，lane 1 與 lane 5 是不含 σ^{54} 的 YMC109^{tk} 宿主細胞，作為負對照組(negative control)。Lane 2 是原型 σ^{54} ，作為正對照組(positive control)。Lane 3 及 lane 4 是 σ^{54} 區域 III 疏水性七重覆的單點突變(IS165 和 IS172)及 lane 6 至 lane 8 則是該區域雙點突變

(LS158/165、IS165/172 和 IS172/179)。可以看到這些突變在轉錄起始點間所形成的張開式複合體訊息大小與原型 σ^{54} 非常相近。而在 lane 9 與 lane 10 參點突變 (LHS-3 及 RHS-3) 所形成的張開式複合體訊息較原型 σ^{54} 少。經過重覆 3 次 KMnO_4 的實驗結果，以原型 σ^{54} 為標準，分析不同突變型的 σ^{54} 對 DNA 雙股分離的能力，數據顯示於(表 3)。

由(表 3)得知，在單點突變(IS165 與 IS172)及雙點突變(LS 158/165、IS165/172 及 IS172/179)所形成的張開式複合體和原型 σ^{54} 相似，顯示這些點突變的 σ^{54} 對 DNA 雙股分離/張開式複合體的影響不大。然而參點突變(LHS-3 與 RHS-3)的張開式複合體含量只有原型 σ^{54} 所形成張開式複合體的 20 %或更少，此結果和 mRNA 產量降低比例相符合，顯示突變三個的疏水性殘基會明顯降低張開式複合體的形成。由上述結果得知突變型 σ^{54} 中有些突變型會造成 DNA 雙股分離能力降低以及造成 mRNA 產量降低，推測可能是突變型 σ^{54} 聚合酶改變在 *glnAp2* 啟動子上結合能力，所以接下來利用足跡法分析 σ^{54} 聚合酶和 DNA 結合的能力。

4. 細胞內 σ^{54} 和 *glnAp2* 啟動子 DNA 之結合能力：

硫酸二甲基足跡法可用來測量這些突變型 σ^{54} 對 *glnAp2* 啟動子-12 區域以及-24 區域結合的影響 (Sasse-Dwight and Gralla, 1988; Popham et al., 1989)。利用硫酸二甲基把 guanine(G)含氮鹼基上的 N-7 甲基化，而一氮六圓(piperidine)可以把甲基化的 guanine(G)含氮鹼

基打斷。因此若是啟動子上有蛋白質結合，則其上的 guanine(G)便無法被硫酸二甲基甲基化，因此一氮六環(piperidine)便無法打斷其上的 guanine(G)。因此，此足跡法可以用來測量 σ^{54} 與啟動子結合的程度。

我們接下來利用活體內實驗(in vivo)硫酸二甲基(Dimethyl sulfate ; DMS)足跡法來分析突變型 σ^{54} 對 *glnAp2* 啟動子上-12 區域以及-24 區域結合的影響。由先前的研究已經證實 DMS 足跡法能夠得知 *glnAp2* 啟動子上的-12 和-24 區域附近因為有 σ^{54} 蛋白的結合而無法被切割，形成一種保護(protection)的狀態。因此以此實驗方法來分析突變型 σ^{54} 對結合的能力。

由(圖 8)顯示，lane 1 是不含 σ^{54} 的宿主細胞，lane 2 是含有原型的 σ^{54} ，比較 lane 1 及 lane 2 的訊號，不含 σ^{54} 的宿主細胞在-12 區域和-24 區域是沒有 σ^{54} 蛋白的結合。 σ^{54} 蛋白的結合是位於-12 區域與-24 區域，而-19 區域沒有 σ^{54} 蛋白的結合，因此-19 區域是一種參考訊號(reference band)，用來比較-12 區域及-24 區域是否有蛋白結合。原型的 σ^{54} 在-12 區域及-24 區域，與-19 區域互相比較，我們視為是呈現百分之百的保護。改變區域 III 疏水性七重覆單點突變 lane 3 與 lane 4 (IS165 及 IS172)，由 DMS 足跡法分析中顯示單點突變 σ^{54} 在-12 區域及-24 區域的結合能力和原型 σ^{54} 相似。而雙點突變 lane 6 至 lane 8 (LS158/165、IS165/172 和 IS172/179) 相比在-12 區域的結合能力與-19 區域的結合能力則介於缺乏 σ^{54} 的宿主細胞及原型 σ^{54} 之間，表示雙點突變在 *glnAp2* 啟動子上-12 區域的

結合能力被破壞。多點突變 lane 9 和 lane 10 (LHS-3 及 RHS-3) 比較在 -12 區域的結合能力及 -19 區域的結合能力，其結果與缺乏 σ^{54} 的宿主細胞相似，由以上 DMS 足跡法結果顯示在區域 III 疏水性胺基酸的改變會漸次影響 σ^{54} 對 *glnAp2* 啟動子上 -12 區域的結合能力降低。

5. 突變 σ^{54} 與核心酵素結合能力分析：

由於 σ^{54} 區域 III 疏水性胺基酸三點突變 (LHS-3 與 RHS-3) 與核心聚合酶 (core RNA polymerase) 的結合能力喪失，而使得嚴重影響轉錄的起始。因此以 Gel mobility shift assay 來分析區域 III 疏水性七重複區域的單點突變 σ^{54} 與雙點突變 σ^{54} 與核心聚合酶的結合能力。我們使用的探針 (probe) 是標定 Biotin 的 *Rm nifH* 啟動子，分析結果 (圖 9) 顯示原型的 σ^{54} (lane 2 與 lane 3/誘導 σ^{54} 表現) 能夠與核心聚合酶形成全酶 (holoenzyme)，而有較高分子的訊號 (supershifted band) (箭頭標示 "H")；核心聚合酶會非特異性結合到 *Rm nifH* 啟動子上，而在較高的位置出現訊號 (箭頭標示 "C")； σ^{54} 單獨結合到 *Rm nifH* 啟動子上而顯現出來的訊號 (箭頭標示 "S")。結果顯示，單點突變 σ^{54} 與核心聚合酶結合能力 (lane 4 與 lane 5) 與原型的 σ^{54} (lane 3) 結果相似，雙點突變 σ^{54} 與核心聚合酶結合能力 (lane 6、lane 7 與 lane 8) 則下降。而三點突變 σ^{54} 與核心聚合酶結合能力 (數據未顯示) 喪失至不可測得，此結果與先前實驗相符合 (Tintut et al., 1994)。

結論

(Discussion)

先前研究已證實 σ^{54} 的 N-端區域 I 上疏水性七重複區域對轉錄起始的機轉具有相當的重要性 (Sasse-Dwight and Gralla, 1990; Hsieh and Gralla, 1994)，已知對 σ^{54} 的 N-端區域 I 上疏水性七重複區域進行點突變，破壞 σ^{54} 全酶對 *glnAp2* 啟動子-12 區域的結合能力，因而降低 *glnAp2* 啟動子製造 mRNA 的能力。因此我們分析大腸桿菌中 σ^{54} 區域 III 上疏水性七重複區域對於轉錄起始是否也扮演重要的角色。早期研究已知，區域 III 上酸性及疏水性區域的截斷突變(Afl II)會影響 σ^{54} 結合到 *glnAp2* 啟動子-12 區域 (Sasse-Dwight and Gralla, 1990)。隨後， σ^{54} 截斷突變的研究指出 σ^{54} 胺基酸 70-184 是和核心酶結合的重要區域，最近研究經由 PCR 在 σ^{54} 胺基酸 158 至 182 進行任意點突變時發現，胺基酸 175 至 180 的片段是重要的核心酶結合區，但是疏水性胺基酸和核心酶結合的重要性則尚未明確定論 (Tintut and Gralla, 1995)。因此此區域 III 上疏水性七重複特定區域對轉錄起始機制的重要性上尚待證實。

先前實驗室已建立區域 III 疏水性七重複胺基酸 leucine 或 isoleucine 的單點突變，雙點突變或參點突變為 serine。區域 III 疏水性七重複區域單點突變 σ^{54} 在 W-arginine X-gal plating 上的表達與製造 mRNA 的能力與原型 σ^{54} 的結果相似，而且雙股分離也與原型 σ^{54} 的結果相似，顯示單點突變 σ^{54} 不會影響轉錄起始的進行。但經由活體試驗足跡分析法及轉錄分析的結果，顯示區域 III 疏水性七重複

區域上雙點突變及參點 leucines 或 isoleucines 突變，同時都會破壞 σ^{54} 對 *glnAp2* 啟動子-12 區域的結合及 *glnAp2* 啟動子製造 mRNA 能力下降至原型 σ^{54} 的 30-40 % 或更少，但是由(圖 8)發現區域 III 疏水性七重複區域上雙點突變及參點 leucines 或 isoleucines 突變並不會破壞 *glnAp2* 啟動子-24 區域的結合，顯示區域 III 疏水性七重複區域對轉錄起始是一個重要的區域。

然而值得注意的是，經由核心酶結合分析發現(圖 9)，雙點突變 σ^{54} 與核心酶結合能力遠比原型 σ^{54} 為低，而參點突變與核心酶結合的能力則低至無法偵測。所以，我們看到破壞此區域超過一個疏水性胺基酸會漸次破壞突變 σ^{54} 與核心酶結合能力而進一步影響對 *glnAp2* 啟動子-12 區域的結合，導致轉錄的進行受阻。所以本實驗分析結果，提供直接證據證實區域 III 疏水性七重複區域是與核心酶結合重要的區域。另一方面，參點突變(LHS-3, RHS-3)與核心酶的結合能力雖見嚴重破壞，但經由活體實驗證實，參點突變 σ^{54} 可以直接與 *glnAp2* 啟動子-24 區域的結合，這是首次在活體實驗中，證實 σ^{54} 本身即有能力結合至 *glnAp2* 啟動子上。

由於已知雙股 DNA 展開必須要全酶(holoenzyme) 結合到 *glnAp2* 啟動子上游區域，而 ATP 水解使得 NtrC 磷酸化，磷酸化的 NtrC 結合到 RNA 聚合酶，形成 DNA looping 的結構，才能使雙股 DNA 分離，進行轉錄的起始 (Su et al., 1990; Sasse-Dwight and Gralla, 1988; Weiss et al., 1991; Wyman et al., 1997)。有趣的是經由足跡法分析轉錄起始點處雙股 DNA 分離成單股 DNA 的實驗結果顯示，雙點突

變 σ^{54} 對轉錄起始點雙股 DNA 展開的能力與原型 σ^{54} 的結果相似，但是 mRNA 的產量卻減少，猜測並非所有的張開式複合體都可有效進行轉錄起始的延長，有一部份的雙股 DNA 分離對轉錄起始是沒有功能的。區域 I 疏水性七重複區域雙點突變 σ^{54} (LS26/33)以及 σ^{54} 胺基酸 26-37 中多個 leucine 改為 serine 的多點突變結果發現雙股 DNA 展開的能力與原型 σ^{54} 的結果相似，而 mRNA 的產量卻減少(Hsieh et al., 1994)，隨後發現此區域點突變 σ^{54} (LS26/33)以及 σ^{54} 胺基酸 26-37 中多個 leucine 改為 serine 的多點突變不需要活化子(NtrC)即可進行轉錄(Wang et al., 1995)。因此，區域 III 中雙點突變 σ^{54} 具有超乎預測的雙股展開能力，是否也與不需要活化子來參與轉錄的進行有關，仍需要再進一步來證實。

參考文獻

(Reference)

- Baga, M., Goransson, M., Normark, S., and Uhlin, B. (1988). Processed mRNA with differential stability in the region of E. coli pili gene expression. *Cell* 52, 197-206
- Cannon, W. V., Chaney, M. K., Wang, X. Y., and Buck, M. (1997). Two domains within σ^N (σ^{54}) cooperate for DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5006-5011.
- Gralla, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 16, 9677-9686.
- Gralla, J. M., (1991). Transcriptional control-lessons from an E. coli promoter data base. *Cell* 66, 415-418.
- Guo, Y., and Gralla, J. D. (1997). DNA-binding determinants of sigma 54 as deduced from libraries of mutations. *J. Bacteriol.* 179(4), 1239-45.
- Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K., Keener, J., and Kustu, S. (1985). Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro: evidence that the ntrA product is a σ factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7525-7529.
- Hsieh, M., and Gralla, J. D. (1994). Analysis of the N-terminal Leucine heptad and hexad repeat of sigma 54. *J. Mol. Biol.* 239, 001-010
- Hsieh, M., Tintut, Y., and Gralla, J. D. (1994). Functional roles for the glutamines within the glutamine-rich region of transcription factor sigma 54. *J. Biol. Chem.* 269, 373-378.
- Magasanik, B. (1988). Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial utilization genes. *Trends Biochem. Sci.* 13, 475-478.
- Magasanik, B. (1993). *J. Cell. Biochem.* 51, 34-40.

- Merrick, M. J., and Gibbins, J. R. (1985). The nucleotide sequence of the nitrogen-features in bacterial Rna polymerase sigma factors. *Nucleic Acid Res.* 13, 7607-7620.
- Merrick, M. J., Gibbins, J. R., and Toukdarian, A. (1987). The nucleotide sequence of the sigma factor gene ntr A (rpoN) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in Ntr A proteins. *Mol. Gen. Genet.* 210, 323-330.
- Nakamaye, K., and Eckstein, F. (1986). Inhibition of restriction endonuclease Nci cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 14, 9697-9698.
- Nifa, A., and Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product NR_G by the glnL product, NR_L, regulates transcription of the glnALG operon in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5909-5913.
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J., and Kustu, S. (1989). Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* 243, 629-635.
- Reitzer, L. J., and Magsanik, B. (1986). Expression of glnA in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1979-1983.
- Reitzer, L. J., Movsas, B., and Magasanik, B. (1989). Activation of glnA transcription by nitrogen regulator I(NR_I)-phosphate in *Escherichia coli*: evidence for a long range physical interaction between NR_I-phosphate and RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 171,5512-5522.
- Ronson, C. R., Nixon, B. T., Albright, L., and Ausubel, F. M. (1987). *Rhizobium meliloti* ntrA (rpoN) gene is required for diverse metabolic functions. *J. Bacteriol.* 169, 2424-2431.
- Sasse-Dwight, S., and Gralla, J. D. (1988). Probing the *Escherichia coli* glnALG upstream activation mechanism in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8934-8935.
- Sasse-Dwight, S., and Gralla, J. D. (1990). Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor σ^{54} . *Cell* 62, 945-954.
- Su, W., Portere, S., Kustu, S., and Echols, H. (1990). Dna-looping and enhancer activity: association between DNA-bound ntrC activator and RNA polymerase at the

bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,5504-5508.

Syed, A., and Gralla, J. D. (1997). Isolation and properties of enhancer-bypass mutants of sigma 54. *Mol. Micro.* 23(5), 987-995.

Tintut, Y., and Gralla, J. D. (1995). PCR mutagenesis identifies a polymerase-binding sequence of sigma 54 that includes a sigma 70 homology region. *J. Bacteriol.* 177, 5818-5825.

Tintut, Y., Wong, C., Jiang, Y., Hsieh, M., and Gralla, J. D. (1994). RNA polymerase binding using a strongly acidic hydrophobic-repeat region of σ^{54} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2120-2124.

Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J., and Kustu, S. (1991). The phosphorylated form of the enhancer-binding NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* 67, 155-167.

Wong, C., Tintut, Y., and Gralla, J. D. (1994). The domain structure of sigma 54 as determined by analysis of a set of deletion mutants. *J. Mol. Biol.* 236, 81-90.

Wang, J. T., Syed, A., Hsieh, M., and Gralla, J. D. (1995). Converting Escherichia coli RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH₂-terminal leucine patch in σ^{54} . *Science* 270, 992-994.

Wyman, C., Rombel, I., North, A. K., Bustaman, C., Kustu, S. (1997). Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* 275, 1658-1661.

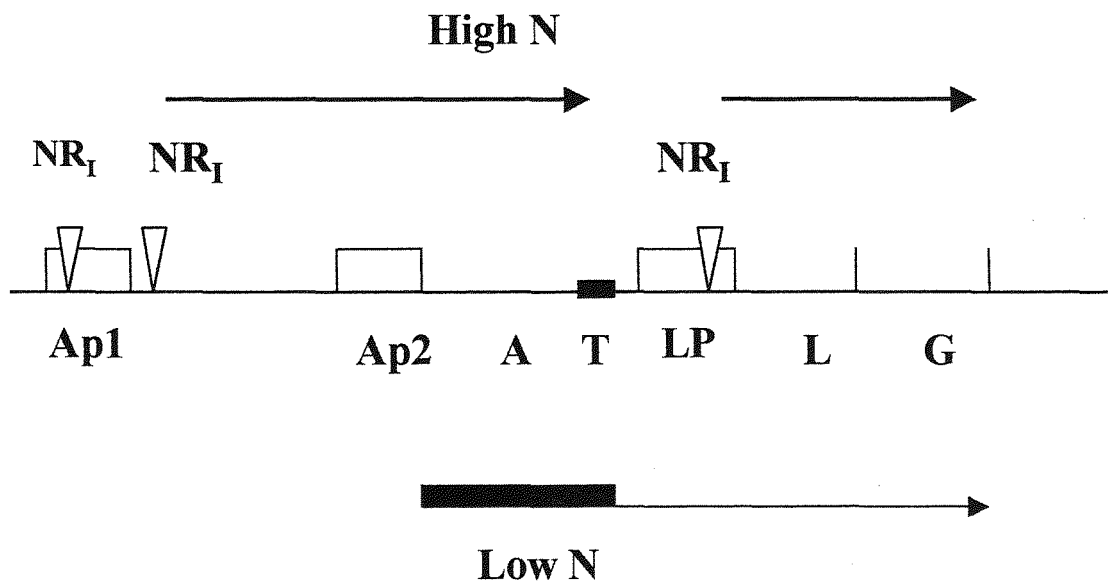


圖1 *glnALG*操縱子，高氮源(High N)或低氮源(Low N)的情形。

□表示啟動子的位置，▽表示NR_I的結合位置，T表示終結子的位置。(轉載自Magasanik, 1988)

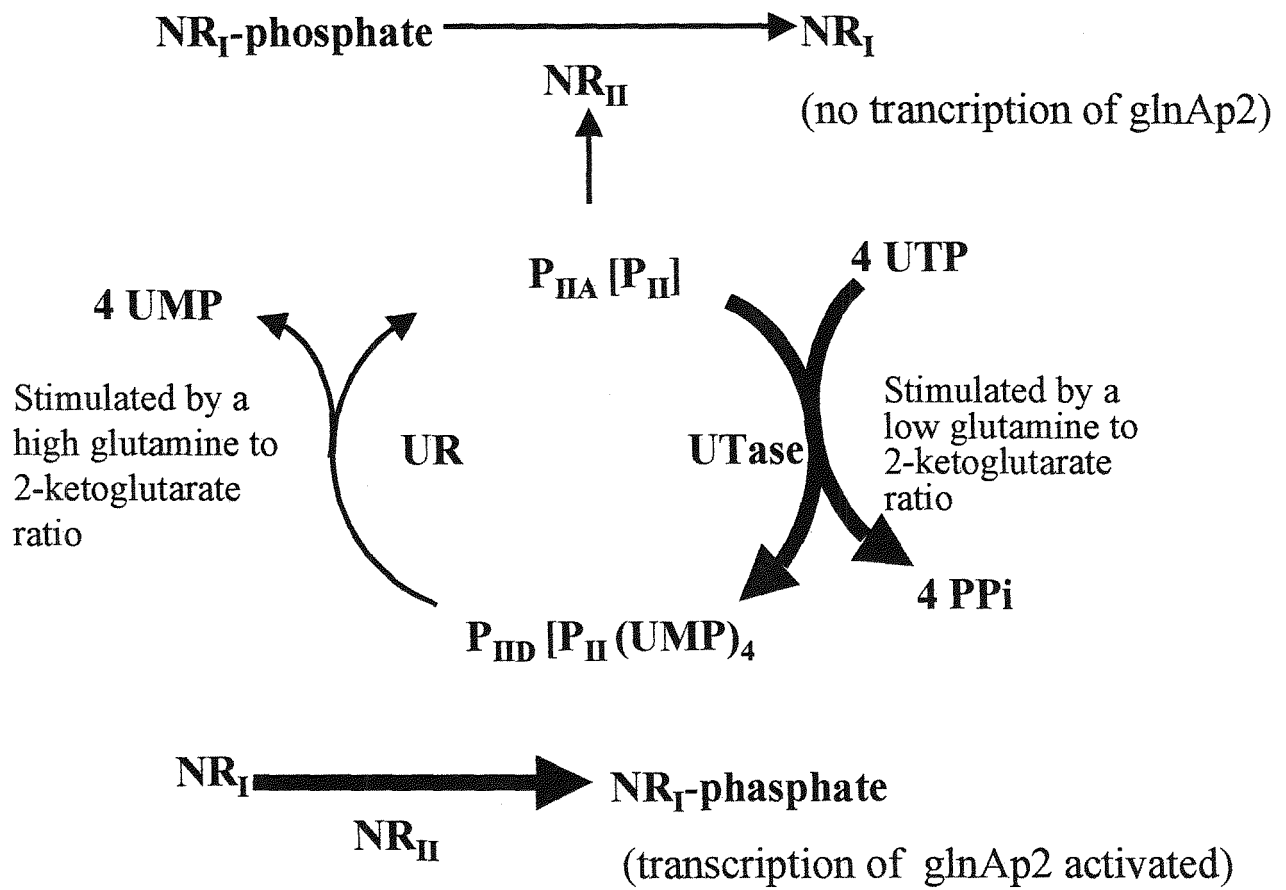


圖2 NR_I 、UR/UTase，uridylyl-removing enzyme/uridylyltransferase對*glnAp2*的轉錄調控情形
(轉載自 *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, Cellular and Molecular Biology.)

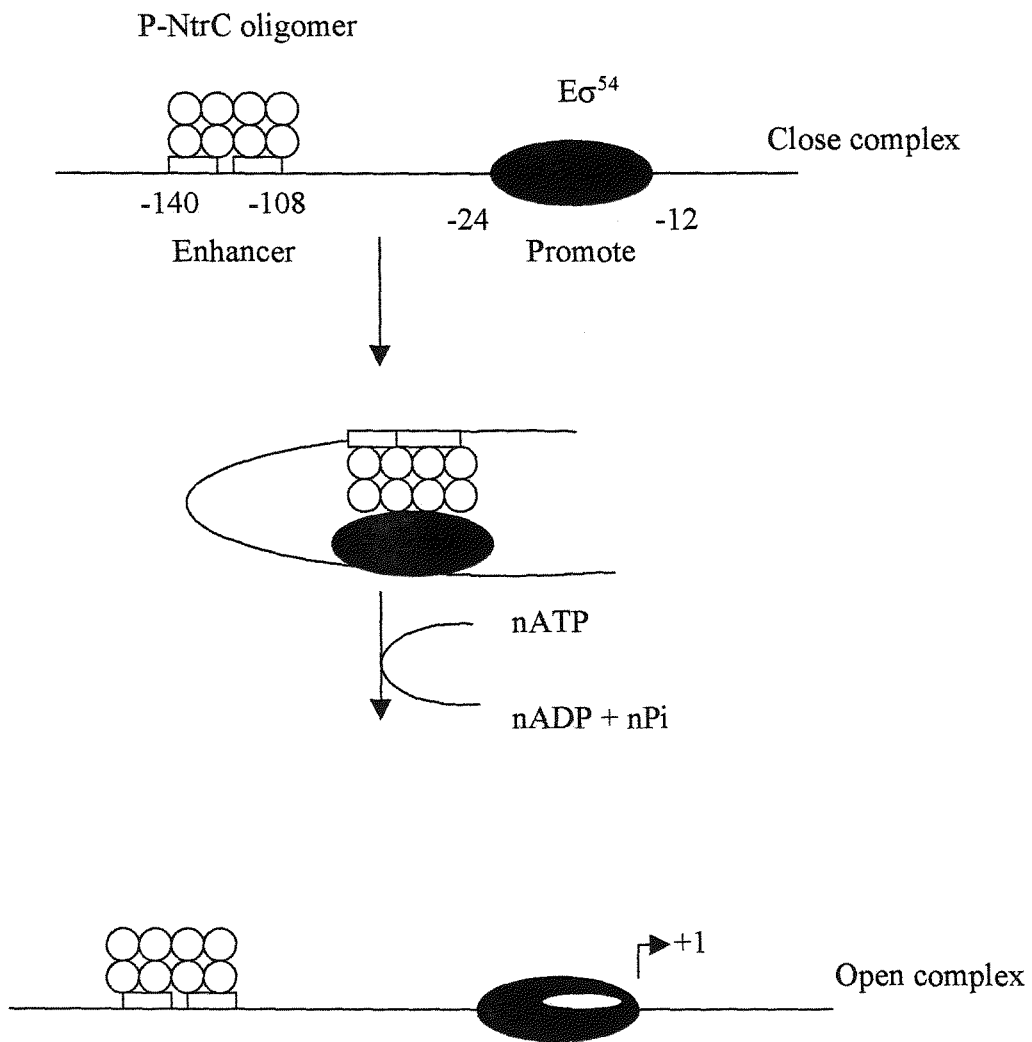


圖 3 Sigma 54轉錄系統

啟動子(*glnAp2*)、全酶($E\sigma^{54}$)、活化子(activator)

P-NtrC : phosphorylated NtrC

(轉載自Wyman et al., 1997)

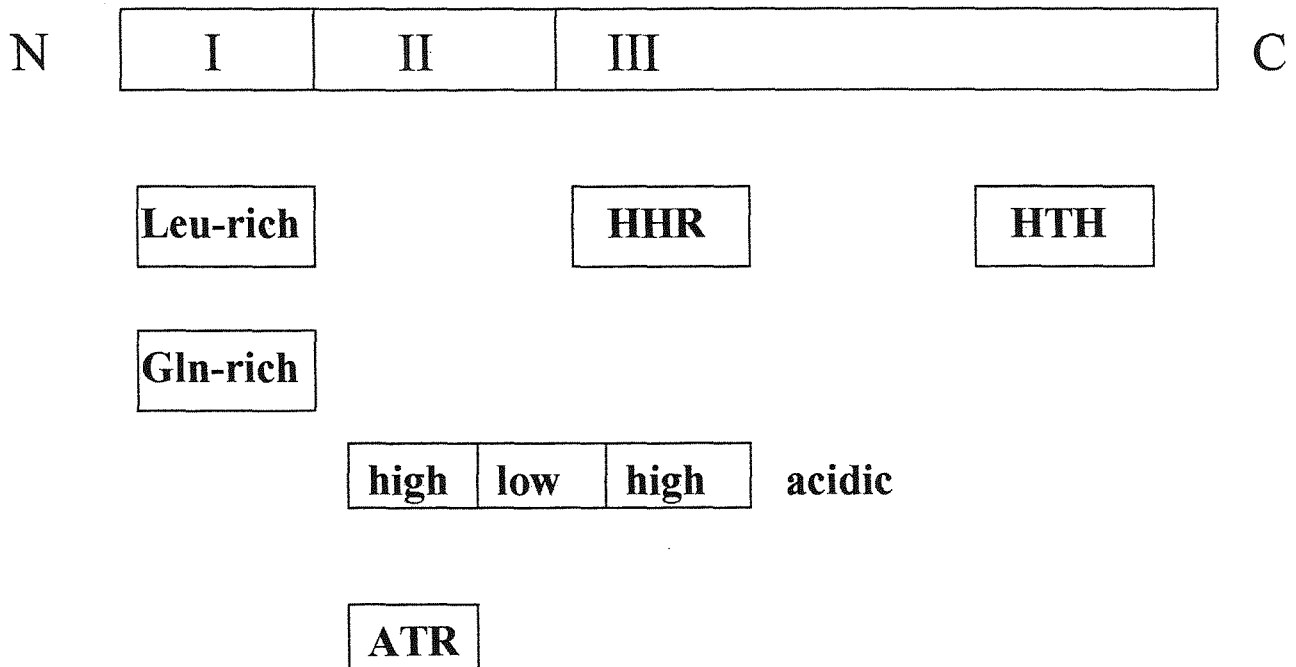


圖4 Sigma 54 的結構區域

Leu-rich (Leucine rich region); HHR (hydrophobic heptad repeat)

Gln-rich (Glutamine-rich region); acidic region (high and acidity)

ATR (acidic trimer repeat) ; HTH(helix-turn helix)

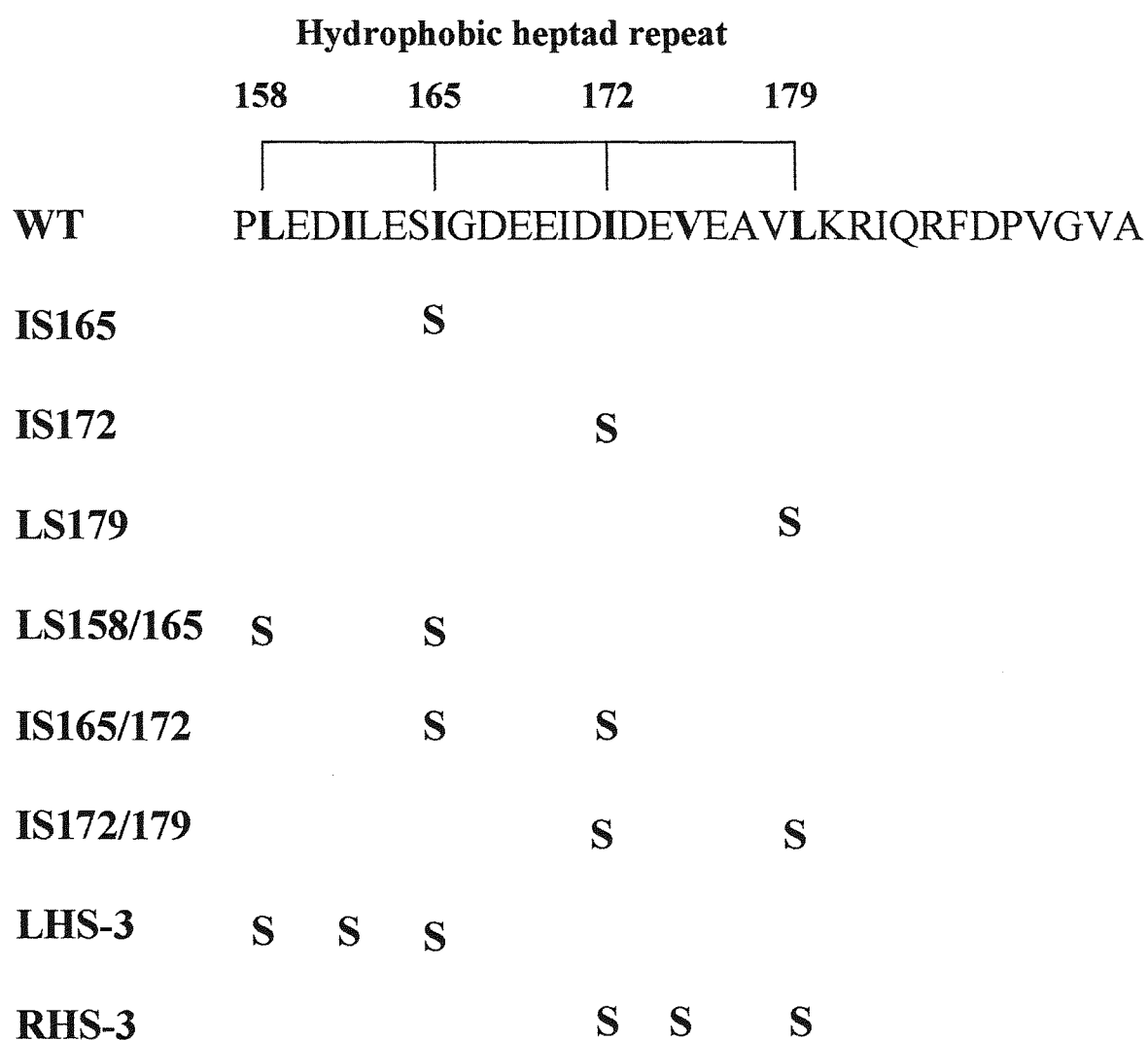


圖5 區域III疏水性七重複胺基酸Leucine (L)或Isoleucine (I)經由點突變改為Serine (S)

Sigma 54	colony color	Sigma 54	colony color
WT	Dark blue		
IS165	Dark blue	IS165/172	Light blue
IS172	Dark blue	IS172/179	Light blue
LS179	Dark blue	LHS-3	Light blue
LS158/165	Light blue	RHS-3	Colorless

表1 區域III疏水性七重複突變型 σ^{54} W-arg在X-gal plate上的顏色變化

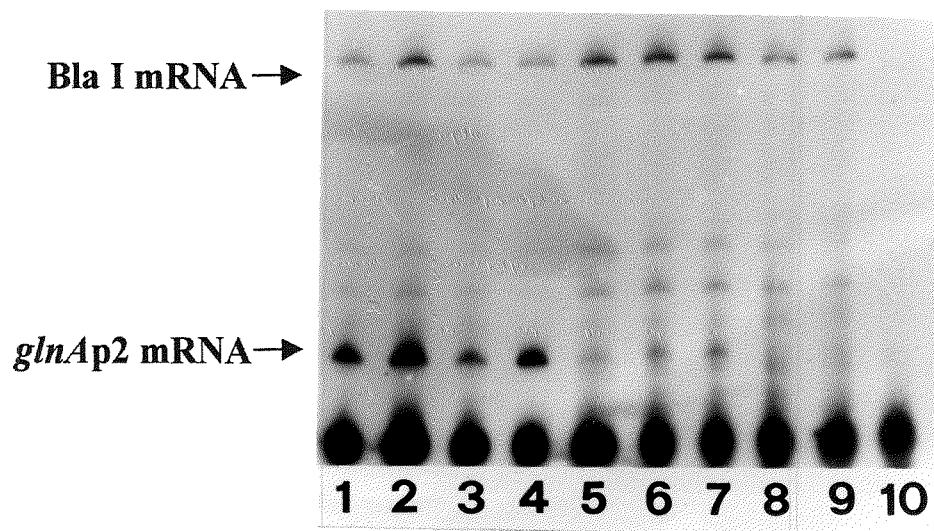


圖 6 mRNA產量分析

20 μ g total mRNA進行反轉錄的反應，分析突變型 σ^{54} 全酶對*glnAp2* mRNA轉錄的影響。

Wilt type (lane 1), IS165 (lane 2), IS172 (lane 3), LS179 (lane 4), LS158/165 (lane 5), IS165/172 (lane 6), IS172/179 (lane 7), LHS-3 (lane 8), RHS-3 (lane 9), and no plasmid (lane 10).

Sigma 54 Relative amount of mRNA		Sigma 54 Relative amount of mRNA	
WT	1.0		
IS	0.7	IS165/172	0.4
IS172	0.8	IS172/179	0.4
LS179	1.0	LHS-3	0.2
LS158/172	0.3	RHS-3	<0.1

表2 區域III疏水性七重複突變型 σ^{54} 轉錄*glnAp2* m-RNA的產量



圖 7 張開式複合體的形成(高錳酸鉀足跡法)

No plasmids (lane 1), wild type (lane 2), IS 165 (lane 3),
 IS172(lane 4), no plasmids (lane 5), LS158/165 (lane 6),
 IS165/172 (lane 7), IS172/179 (lane 8), LHS-3 (lane 9),
 and RHS-3 (lane 10)

Sigma 54 Level of melting		Sigma 54 Level of melting	
WT	1.0		
IS165	0.8	IS165/172	0.8
IS172	0.9	IS172/179	0.8
LS179	0.9	LHS-3	0.2
IS158/165	1.0	RHS-3	<0.1

表3 區域 III 疏水性七重複突變型 σ^{54} 於 *glnAp2* 轉錄起始點形成的張開式複合體的分析

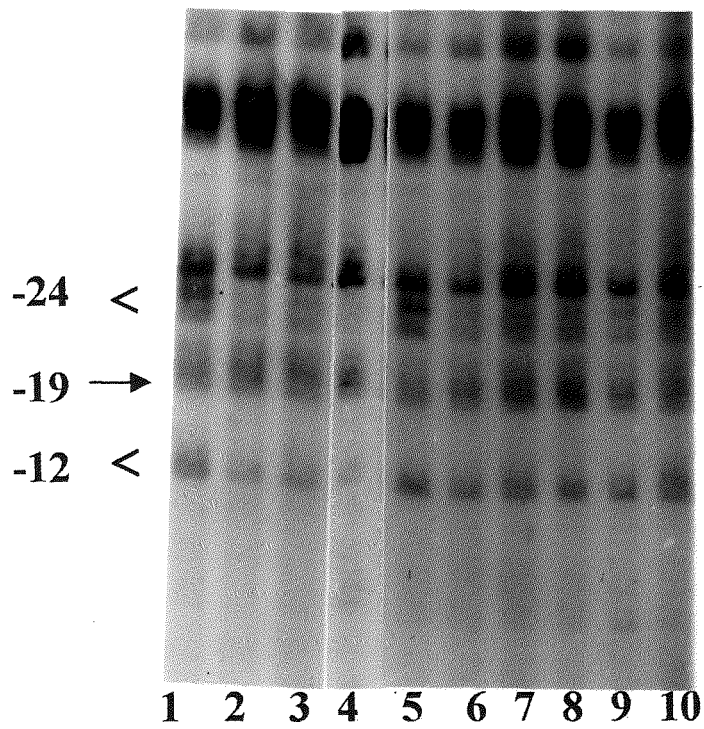


圖8 Sigma 54對*glnAp2*啟動子的結合能力(硫酸二甲基足跡法)

No plasmid (lane 1), Wild type (lane 2), Is165 (lane 3)
 IS172 (lane 4), no plasmids (lane 5), LS158/165 (lane 6),
 IS165/172 (lane 7), IS172/179 (lane 8), LHS-3 (lane 9),
 and RHS (lane 10)

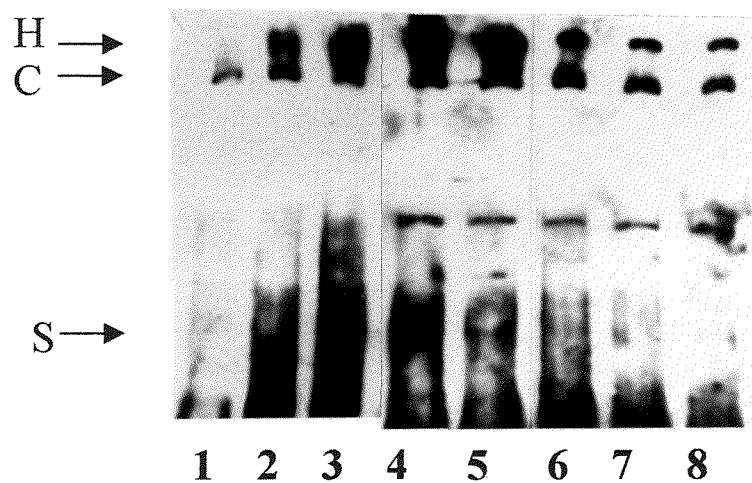


圖 9 Sigma 54與核心酶結合能力分析

(Gel mobility shift assay)

- H: holoenzyme, C: core enzyme, S: sigma 54
- no plasmids (lane 1), wild type no induced (lane 2), wild type with induction (lane 3), IS 165 (lane 4), IS172 (lane 5), LS158/165 (lane 6), IS165/172 (lane 7), IS172/179 (lane 8).

第二部分

Machado-Joseph Disease 蛋白之分生研究

Molecular Studies of Machado-Joseph Disease
Protein

中文摘要

Machado-Joseph 疾病是晚發性的體染色體顯性遺傳性疾病，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梢肌萎縮、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，因此我們藉由培養含有 MJD 蛋白的淋巴母細胞來處理 lamotrigine 後，觀察蛋白的表現變化。

建立淋巴母細胞株，其中包含有已發病、未發病之成員及正常人，細胞來處理 lamotrigine 後，以西方轉漬法分析 MJD 蛋白表現。在未加入 lamotrigine 處理前，在已發病、未發病的 MJD 蛋白表現並無差異，而加藥物處理後發現 lamotrigine 的濃度由 50 μM 增加到 300 μM 時，會降低 MJD 蛋白的表現，顯示 lamotrigine 對 MJD 蛋白的表現有劑量相關性。這個結果與臨床觀察的現象相似，希望能夠更清楚了解 lamotrigine 對 MJD 的治療所扮演的角色及對 MJD 的致病機轉的研究有所幫助。

英文摘要

(Abstract)

We have investigated in the present study the effect of lamotrigine (LTG) on the Machado-Joseph disease protein (ataxin-3) in cultured lymphoblastoid cells. 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. Encouraged by the clinical observation, we carried out the expression analysis of ataxin-3 in cultured cells to understand the molecular basis for this observation.

Lymphoblastoid cell lines (LCLs) from patients, at-risk individuals, and normal control were established. Western blot analysis was then performed to study the expression of ataxin-3 protein in cultured cells under the treatment of LTG. Even though the ataxin-3 protein levels show no observed differences among patients' and at-risk individuals'

LCLs before drug treatment, our results demonstrated that the LTG-treated MJD cells express less mutant ataxin-3 proteins. Extracellular application of LTG (50 to 300 μ M) decreased the expression of mutant ataxin-3 protein in a dose-related manner. This observation is consistent with the clinical phenomena. Further analysis is underway for better understanding of the role(s) which lamotrigine 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苷酸重覆序列(trinucleotides repeat)有關 (Sutherland and Richaeds, 1995)。不穩定的三核苷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 三核苷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)、小腦脊髓幹運動失調症第一型(Spinocerebellar ataxia type 1; SCA1) (Joice et al., 1994; Ranum et al., 1994)、小腦脊髓幹運動失調症第二型 (Spinocerebellar ataxia type 2; SCA2) (Pulst et al., 1996; Sanpei et al., 1996; Imbert et al., 1996)、小腦脊髓幹運動失調症第三型 (Spinocerebellar ataxia type 3; SCA3/Machdo-Joseph Disease; MJD) (Kawaguchi et al., 1994; Maciel et al., 1995)、小腦脊髓幹運動失調症第六型(Spinocerebellar ataxia type 6; SCA6) (Zhuchenko et al., 1997)、小腦脊髓幹運動失調症第七型(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)。此類疾病基因中三核苷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 100 次以上，但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 三核苷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)及 Friedreich's ataxia (FA) (Campuzano et al., 1996)等，此類疾病基因中三核苷酸重覆序列倍增突變極為不穩定，可重覆上百次或上千次，基因突變並不會造成神經退化性疾病，但會引起肌肉萎縮、智障等遺傳疾病，致病機制可能為 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)遺傳性疾病 (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)。

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)、末稍肌萎縮(distal muscular atrophies)、臉部及舌的顫搐(facial and lingual fasciculation) (Coutinhon et al., 1977 ; Lima and Coutinho, 1980)。根據其發病年齡、發病的部位及運動神經元退化的情形，可分為三種亞型(subphenotype) (Coutinho and Andrade, 1978)。第一型、早發型(earlier onset)：此型的臨床症狀顯現的較早且嚴重，發病年齡約 20-30 歲(平均約在 24.3 歲)，較顯著的病徵為錐體及外錐體路徑的症狀。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 46.8 歲，主要的病症有末稍肌萎縮、小腦運動失調及眼肌麻痺。

早期對 MJD 的研究方向著重於臨床症狀、病理變化，近年來在分子生物學的發展，在 1993 年，Takiyama 等人利用連鎖(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 MJD 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。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) 及 SCA 2 (Pulst et al., 1996 ; Sanpei et al., 1996 ; Imbert et al., 1996) 研究發現，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/ataxia-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)。而腦部正好是 MJD 病症所在，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)。最近研究並且顯示出 MJD/ataxin-3 蛋白累積於腦部神經細胞核內形成包含物 (inclusion body) (Paulson et al., 1997)，推測可能經由包含倍增醯胺麩胺酸的 MJD 蛋白片段促使或催化(catalyzed)，而使醯胺麩胺酸倍增片段和正常蛋白造成包含物在核內聚集。

有關 MJD 疾病的治療至目前為止仍根據臨床徵狀來治療。在以前曾指出以 Sulphamethoxazole 和 Trimethoprim (Bactrim) 治療 MJD 疾病所造成的步態不穩和運動不協調 (Sakai, et al., 1995)，但均無研究說明藥物對疾病的治療機制。因此，為了了解藥物對 MJD 的分生機制，我們建立淋巴母細胞株 (lymphoblastoid cell line; LCL)，其中包含有已發病、未發病之成員及正常人。由一個有五代家族中建立六個成員的 MJD 淋巴母細胞株，包含三個已發病，三個未發病 (Hsieh et al., 1997)。Lamotrigine，[3, 5-diamino-6-(2, 3-dichlorophenyl)-1, 2, 4-triazine] 是一種 phenyltriazine 化合物，也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癲癇。經過臨床的觀察，被發現可以專一性改善 MJD 病人的主要病症。因此，我們運用分生實驗方法 (西方轉漬法/Western blot) 分析 MJD 蛋白變化來探討 lamotrigine 此藥物如何改善 MJD 的病症。

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 疾病患者抽取的血液。
2. 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。

二、 MJD 蛋白的表現:

(Expression of MJD protein)

以製備好的 MJD 蛋白表現質體(protein express plasmid) (Hsieh et al., unpublsh data)送入大腸桿菌菌株 M15 中，將其塗抹在含有抗生素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin)的 Luria-Bertani 培養基(LB agar)中，於 37°C 過夜培養。然後挑單一菌株到含抗生素的(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin)的 Luria-Bertani 培養液(LB medium)中，於 37°C 過夜培養。然後以 1:100 的稀釋到新鮮的 LB 培養液(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 和 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin) 中。直到菌液生長的濃度達到 OD_{600} 約 0.6-0.7 左右，加入 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)(最後濃度為 1mM)誘導蛋白的表現。

經過 37°C 培養箱中培養兩個小時後，取出菌液並將菌液離心，

將菌體溶於 cell extract buffer (buffer A : 50 mM Tris , 10 mM β -mercaptoethanol , 1 mM PMSF , 1 % Nonidet P-40) 中 , 以超音波震盪器將細胞震碎 , 直到菌液澄清為止 , 離心後將上清液轉移到新的離心管 , 取部分上清液進行 10 % SDS-PAEG 分析。

三、 MJD 蛋白的純化:

(Purification of MJD protein)

取 2 ml Ni-NTA resin (QIAGEN) 放入管柱 (column) 中 , 並且加入 2 ml buffer B (20 mM Tris , 100 mM KCl , 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol , 20 mM imidazole , pH8.5 於 4 °C) 平衡管柱 , 然後將溶於 buffer A 中的上清液加入管柱中 , 收取通過管柱後的液體 (flow through) , 在利用含有不同濃度的 imidazole 的 buffer (20 mM Tris , 100 mM KCl , 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol , 20 mM imidazole , pH8.5 於 4 °C) 來清洗管柱 , 收取清洗管柱後的液體 (wash protein) 。

最後以含有 100 mM imidazole 的 buffer C (20 mM Tris , 100 mM KCl , 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol , 100 mM imidazole , pH8.5 於 4 °C) , 加入 4 ml 的 buffer C , 將結合在 Ni-NTA resin 的 MJD 蛋白洗下來 , 收下來的液體稱為 elute protein 。將收下來的 flow through 、 wash 1 、 wash 2 、 wash 3 、 elute 1 、 elute 2 、 elute 3 、 elute 4 液體 , 分別取 10 μ l 的收集液 , 跑 10 % SDS PAGE , 經由 Coomassie blue 染色方法來確定 MJD 蛋白是否被 Ni-NTA resin 純化

出來。

四、 抗體的製備:

(Preparation of antibody)

取 500 μ g 的 MJD 蛋白質來免疫兔子,在免疫兔子前先抽取 5 ml 的血液靜置於 4°C 中 24 小時後離心 2000rpm, 30 分鐘, 然後抽取血清(pre-immune)。第一次免疫(first immune)是將 MJD 蛋白質與 adjuvant complete freund 以 1:1 的體積比例均勻混和後, 注射於兔子的皮下。注射後 2 星期, 抽取 5ml 的血液後再追加注射第二次免疫(second immune), 取 500 μ g 的純化的 MJD 蛋白質與 adjuvant incomplete freund 以 1:1 的體積比例均勻混和後, 注射於兔子的皮下。1 星期後抽取血清測其抗體力價(antibody titer)的高低。

五、 SDS-聚丙烯醯板膠電泳法:

10% SDS-PAGE

	Resolving gel	Stacking gel
Acrylamide-bisacrylamide (29:1)	2.5ml	0.562ml
1.5M Tris-Hcl pH8.8	2.5ml	
0.5M Tris-Hcl pH6.8		1.25ml
10% SDS	0.1ml	0.05ml

10% ammonium persulfate	75 μ l	15 μ l
TEMED	15 μ l	4 μ l
d ₂ H ₂ O	5ml	3.188ml

六、 西方轉漬法:

(Western blot)

將 SDS-PAGE 電泳分析之膠體、nitrocellulose paper (NC paper) 或(PVDF paper)及濾紙(filter)，以三明治方法夾於 transfer cassette 中，置於 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) 加入 transfer buffer (12mM Tris pH 8.3, 96 mM Glycine, 20 % Methanol) ，以電流 100 伏特進行 1 小時或 30 伏特過夜。轉漬後的 blot 浸泡於 TBS buffer (Tris Buffered Saline; 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl)(含 5% 脫脂牛奶)進行 blocking，室溫下溫和搖晃 1 小時，倒出 blocking buffer，加入含有第一次 MJD 抗體單株抗體(monoclonal Anti-MJD/1:2000 與 β -actin/1:200000)(Wang et al., 1997)的 TBS Buffer (含 0.5 % 脫脂牛奶)，於 4°C 下搖晃過夜。倒出第一次抗體，以 TBS 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 TBS Buffer (含 1 % 脫脂牛奶)，於室溫下搖晃 1 小時。倒出第二次抗體，以 TBS 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 光片下曝光，曝光時間依訊號強弱而定。

七、 細胞培養:

(Cell culture)

淋巴母細胞株(Lymphoblastoid cell)培養於含培養液(10% FBS-RPMI1640-PSN-glutamine)的 75 cm² 培養瓶中，將培養瓶置於 37°C，5 %二氧化碳培養箱。待細胞長滿後，於 1500 rpm 離心 10 分鐘，將細胞收下來，用 PBS 洗二次後放置-80°C 備用。

八、 細胞質抽取液製備:

將細胞加入 500 μ l 的 Extraction buffer (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 PMSF; 0.5 % Triton X-100)，混合均勻，置於冰水中，在以超音波震盪器連續震盪 30 秒，重覆 2~3 次。

在 4°C 下以 12000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液，利用蛋白分析方法(取 10 μ l 細胞質萃取液，加入 200 μ l Bradford，加入 d₂H₂O 至 1000 μ l)與標準蛋白(Bovine serum albumin; BSA)做比較，經由測其可見光 595 nm 的吸光質(OD₅₉₅)做到蛋白的定量，保存於-20°C。

九、 週邊血液蛋白質的抽取:

將 5 ml 的新鮮血液加入等量的 1 倍 PBS buffer (10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl), 混合均勻後的液體緩緩加入於 5 ml 的 Ficol-Paque 上, 離心 1500 rpm, 30 分鐘。取出 Buffy coat 層, 加入 1 倍 PBS 至 10 ml 清洗 3 次, 離心 1500 rpm, 10 分鐘。取 cell pellets 加入 500 μl 的 Extraction buffer (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, 以超音波震盪器連續震盪 30 秒, 然後置於冰水中, 重覆 3 次。在 4°C 下以 12000 rpm 離心 20 分鐘後取上清液, 定量蛋白之後, 保存於 -20°C。

結果

(Result)

一、多株抗體的製備

含全長 MJD 蛋白在大腸桿菌菌株 M15 中表達而且經由 IPTG 誘導蛋白大量表現，全長 MJD 蛋白 N-端含有 6 個 Histidine 的標籤 (tag)，因此可經由含有正二價鎳離子的管柱(Ni-NTA resin column) 來純化 MJD 蛋白。在純化過程中收取下來的各部分收集液(flow through、wash 1、wash 2、wash 3、elute 1、elute 2、elute 3 及 elute 4) 分別進行 10%的 SDS-PAGE，Coomassie blue 染色的結果(圖一)。

由(圖一)所顯示，lane 1 是沒有經過 IPTG 誘導的 MJD 蛋白，lane 2 是經過 IPTG 誘導的 MJD 蛋白，lane 3 是 flow through，lane 4 至 lane 6 是 wash，lane 7 至 lane 10 是 elute 蛋白。在 elute 2 和 elute 3 時已能收下大部分的 MJD 蛋白量，收集 2~3 次的純化 MJD 蛋白量來製備 MJD 蛋白的多株抗體。收集 500 μ g 的 MJD 蛋白濃度打入兔子的皮下，經過 2~3 星期，抽取兔子的血清。為了測定多株抗體對 MJD 的特異性，分別利用含有 MJD 的純化蛋白、正常人的淋巴母細胞與 MJD 患者的淋巴母細胞來偵測所製備的 MJD 多株抗體的特異性。結果顯示抗體可辨認到純化的 MJD 蛋白，同時抗體也可辨認到正常人與患者的淋巴母細胞中正常的 MJD 的蛋白(50 kDa)和倍增的 MJD 蛋白(60 kDa)(圖二)。但是 MJD 多株抗體在偵測時會辨認到非特異性的蛋白，因而使得 MJD 多株抗體非專一性的辨識 MJD 蛋白，因此我們必須進一步純化此多株抗體，才能利用 MJD 多株

抗體來偵測特異性的 MJD 蛋白。在同時，我們藉由共同合作方式取得 MJD 單株抗體(Wang et al., 1997)，此抗體對正常及突變 MJD 蛋白均有相當高的專一性，因此，我們使用此抗體進行以下的實驗。

二、利用單株抗體檢測 MJD 淋巴母細胞株中 MJD 蛋白:

實驗室先前所建立的 3 個已發病的 MJD 患者的淋巴母細胞株 (MJD001、MJD004 和 MJD006)，以及 3 個未發病但帶有 ataxin-3 CAG 倍增的淋巴母細胞株 (MJD002、MJD003 和 MJD005)，經由分生診斷分析淋巴母細胞株 CAG 重覆次數(表二)(楊千瑩碩士論文)。將淋巴母細胞株經過培養後抽取細胞中的蛋白質，以 Western blot 方法分析 MJD 蛋白的表現。(圖三)是一個正常人的淋巴母細胞株，含有兩個正常的 MJD 蛋白，(圖四)顯示的是 6 個含有正常的 MJD 蛋白及倍增的 MJD 蛋白的淋巴母細胞株，經由單株抗體所偵測的結果。在西方轉漬法中，單株抗體偵測到正常的 MJD 蛋白與倍增的 MJD 蛋白的蛋白分子量，與先前實驗室定序出這 6 個 MJD 淋巴母細胞株的 CAG 重覆序列的蛋白質分子量是相符合的。(圖四)的結果也顯示出已發病患者的及未發病的淋巴母細胞株，所表現出倍增的 MJD 蛋白並無明顯的差異，此結果與先前研究指出在腦部組織中正常的與倍增的 MJD 蛋白量是相似的 (Paulson et al., 1997)。同時，年齡與 MJD 蛋白含量並無相關性。

三、抗癲癇藥物處理 MJD 淋巴母細胞:

由臨床醫師指出，抗癲癇藥物 lamotrigine 能夠改善 MJD 患者的臨床主要症狀，而其他的抗癲癇藥物則無法改善 MJD 患者的症狀，因此我們為了探討 lamotrigine (LTG)藥物對 MJD 疾病的影響，所以在淋巴母細胞株培養過程中，分別使用溶於 DMSO 中的 lamotrigine (LTG)與 dilantin 兩種抗癲癇藥物來處理細胞。細胞培養液中 DMSO 濃度是 1 $\mu\text{l/ml}$ ，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(數據未列出)。取 MJD006 的淋巴母細胞株分別處理 50 μM 、100 μM 、200 μM 、300 μM 、400 μM 與 500 μM 濃度的 lamotrigine (LTG)，經過 48 小時處理 lamotrigine (LTG)後，以西方轉漬法分析，結果顯示於(圖五)。 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 倍增蛋白與 MJD 正常蛋白的表達影響(圖六與圖七)。由(圖六)的柱狀圖分析顯示出在 50 μM 、100 μM 、200 μM 與 300 μM 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 50 μM 至 300 μM 的 lamotrigine (LTG)會使得倍增多醯胺麩胺酸(polyglutamine)的 MJD 蛋白表現下降 10 %至 30 %，此結果是具有統計上的意義 ($p < 0.05$)。(圖七)的柱狀圖分析顯示不同濃度的 lamotrigine (LTG)相對於沒有處理藥物(no treatment)或只加入 DMSO 處理，含正常長度多醯胺麩胺酸(polyglutamine)的 MJD 蛋白表達在統計上是沒有差異($P > 0.05$)。表示 lamotrigine (LTG)不會影響正常的 MJD 蛋白表現。

另一方面，我們也使用另一種抗癲癇藥物來處理 MJD 淋巴母細胞株，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 MJD 淋巴母細胞株培養過程中，加入溶於 DMSO 的 dilantin 來處理細胞，將 MJD006 的淋巴母細胞株分別處理 100 μ M、200 μ M、300 μ M 與 400 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(圖八)。經過定量的結果，dilantin 不會影響 MJD 正常的或倍增的多醯胺麩胺酸(polyglutamine)蛋白表現。

四、MJD 病人血液中 MJD 蛋白表現

由服用藥物 LTG 長達 1 年以上的 MJD 病人的周邊血液所得到的蛋白質，經過 Western blot 以 MJD 單株抗體與 β -actin 的單株抗體(internal control)分析，與正常人的周邊血液的蛋白質相比較的結果(圖九)。MJD 病人 CAG 重覆序列為 17 與 78，由圖六顯示出 MJD 病人正常的 MJD 蛋白表現比正常人的低，重覆 3 次實驗的結果，均未發現含倍增的多醯胺麩胺酸(polyglutamine)的 MJD 蛋白。故推測長期服用藥物 LTG 的 MJD 病人血中的 MJD 蛋白表現量極少所致。

討論

(Discussion)

近年來，許多三核苷酸重覆序列倍增突變疾病的基因座的位置已知，並進一步被選殖(clone)出來。造成三核苷酸重覆序列倍增突變的原因，近幾年所提出可能的原因，例如減數分裂的不穩定性(meiotic instability)、創始者的染色體效應(founder chromosome effect)(Richards et al., 1992)及非對等交換(unequal crossing over)等，這些因素都可能是造成 CAG 重覆序列倍增的長度變化，但是所產生的突變蛋白質的功能，是否可能改變蛋白間的交互作用 (Paulson et al., 1997)進而造成神經退化病徵，仍然不清楚。

許多 CAG 三核苷酸重覆序列倍增突變所引起的疾病，如 DRPLA、SCA1、HD 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 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)，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內容物(neuronal intranuclear inclusions/NIs)聚集的現象 (Davies et al., 1997)。近來研究發現，CAG 三核苷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)，在神經病理普遍發現神經核內有 NIIs 的存在，NIIs 是多醯胺麩胺酸片段蛋白聚集，NIIs 因而影響或阻斷核內正常的蛋白水解過程受阻 (Paulson et al., 1997)，可能對會影響或加速病程發展。

蛋白質中多醯胺麩胺酸蛋白增加時，可經由 transglutaminase-catalysed isopeptide 的交叉結合(cross-linking)，而與其他蛋白質相接合 (Green et al., 1993)。當多醯胺麩胺酸蛋白片段增加時，會經由氫鍵的鍵結而形成 β -sheets，而造成 polar zipper 結構，導致 homodimerization 或非專一性的鍵結到其他調節蛋白 (Perutz, M. 1994)。多醯胺麩胺酸蛋白片段增加，容易成為醯胺麩胺酸轉移酶催化(transglutaminase-catalysed)的受質，與腦部萃取出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酶時，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)中加入醯胺麩胺酸移酶(transglutaminase)的抑制物，能夠降低細胞中聚集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聚集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。

本篇實驗所使用的 lamotrigine 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 neurotransmitter glutamate。當老鼠暴露在 kainic acid (一種與 glutamate receptor 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，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，因此在本篇實驗中，以 LTG 來處理淋巴母細胞，觀察 LTG 對蛋白的表現影響。發現 LTG 在 50 μ M 至 300 μ M 的濃度下，能夠降低 20-30 % 的 MJD 突變的蛋白質產量，而且並不影響 MJD 正常的蛋白質的表現。但是 LTG 濃度大於 400 μ M 時，MJD 突變的蛋白質產量並不會減少，可能與 LTG 的藥物副作用有關。有 10 % 的病人會產生副作用，包括頭暈(dizziness)、diploia、運動失調 (ataxia)及嗜睡(somnolence) (Gilman, 1995)。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。

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 突變的蛋白質產量。LTG 如何影響多醯胺麩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)會與倍增的 CAG 重覆序列有專一性的交互作用，改變突變的 huntingtin 蛋白質的產量，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)。推測若 RNA 結合蛋白與突變 MJD 的 mRNA 交互作用，LTG 促使 RNA 結合蛋白與 mRNA 結合而降低多醯胺麩胺酸蛋白質的產量或改變 RNA 的表現量。由 CAG

三核苷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)中均發現含多醯胺麩胺酸蛋白質在核內聚集累積形成內容物(neuronal intranuclear inclusions/NIIs)，而且會造成運動神經退化性症狀出現，猜測 NIIs 會影響神經退化的病程發展。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。推測若症狀的病程發展與 NIIs 有關，則 LTG 可以降低突變蛋白質的表達量進而減緩多醯胺麩胺酸蛋白質在核內聚集物的速度。但是若要進一步證實這些假說，均需其它的實驗來支持。

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 的相關研究有很大的助益！

參考文獻

(References)

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

Burright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., Zoghbi, H. Y., Orr, H. T. (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell.*, 82. 937-948.

Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., Michele, G.D., Filla, F., Frutos, R.D., Palau, F., Patel, O.I., Donato, S.D., Mandel, J-L., Coccozza, S., Koenig, M., Pandolfo, M.(1996) Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat 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.

Coutinho, P., Calheiros, J.M., 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., Giunti, P., Benomar, A., Wood, N., Ruberg, M., Agid, Y., Mandel, J. L., and Brice, A. (1997) Cloning of the SCA7 gene a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.*, 17, 65-70.

Davies, S.W., Beardsall, K., Turmaine, M., DiFiglia, M., Aronin, N., Bates, G.P. (1998). Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions? *Lancet*, 351. 131-133.

Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarinin, L., and Bates, G.P. (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, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., 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., Folstein, S., et al., (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Gene.*, 4, 387-892.

Gilman J.T. (1995). Lamotrigine: An antiepileptic agent for the treatment of partial seizures. *The Annals of Pharmacotherapy.*, 29, 144-151.

Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., and Hayden, M.R. (1996). *Nature Genet.*, 13, 442-449.

Green, H. (1993) Human genetic disease due to codon reiteration: Relationship to an evolutionary mechanism. *Cell.*, 74, 955-956.

Healton, E.B., Brust, J.C.M., Kerr, D.L., Resor, S., 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). Spincerebellar ataxia type 7 (SCA 7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusion. *Hum. Mol. Genet.* 7, 913-918.

Hsieh, M., Tsai, H. F., Lu, T. M., Yang, C. Y., Wu, H. M., and Li, S. Y. (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., Nakano, R., 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.

Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., 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., Trottier, Y. et al. (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, J.L. (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.

Jodice, C., Malaspina, P., Persichetti, F., Novelletto, A., Spadaro, M., Giunti, P., Morocutti, C., et al., (1994) Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 54, 959-965.

Kahlem, P., Terré, C., Green, H., 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., Kawakami, H., et al. (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., Miike, T., Naito, H., Ikuta, F. and Tsuji, S. (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluyisian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.*, 6, 9-13.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., Fischbeck, K.H. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.*, 352, 77-79.

Lima, L., and Coutinho, P., (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurol.*, 30, 319-322.

Livingstone, I. R., Sequeiros, J. (1984) Machado-Joseph disease in an American-Italian family. *J. Neurogenet.*, 1, 185-188.

Lunkes, A., and Mandel, J.L. (1997). Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration. *Nature medicine.*, 3, 1201-1202.

Macil, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, L., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sundarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E.L., Nezarati, M.M., Corwin, L.L., 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, B. A., Spencr, C., 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., Lehrach, H., Davies, S.W., and Bates, G.P. (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.

Mani mahadevan, Catherine Tsilfidis, Luc Sabourin, Gary Shutler, Chris Amemiya, Gert Jansen, Catherine Neville, Monica Narang, Juana Barcelo, Kin O'Hoy, Suzanne Leblond, Jane Earle-Macdonald, pieter J. de Jong, Be Wieringa, Robert G. Kornelut. (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.

Nakano, K.K., Dawson, D.M., Spence, A. (1972) Machado Disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Masschusetta. *Neurol.*, 22, 49-55.

Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure IV, L.S., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., Albin, R.L., and Detloff, P.J. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological pphenotype in the mouse. *Cell.*, 91, 753-763.

Paulson, H.L., Perez, M.K., Trotter, Y., Trojanowaki, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., and Fischbeck, K.H. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinoceberellar ataxia type 3. *Neuron.*, 19, 333-344.

Perutz, M. (1994) Polar zippers: Their role in human disease. *Protein Sci.*, 3, 1629-1637.

Pulst, S.-M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.-N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S. et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.*, 14, 269-276.

Pulst, S.M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Diaz, G., Lunkes, A., DeJong, P., Rouleau, G., Auburger, G., Korenberg, J.R., 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 L.P.W., Chung, M., Banfi, S., Bryer, A., Schut, L.J., Rameser, R., Duvick, L.A. et al. (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., Wakisaka, A. et al. (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., 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, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1995) Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nature Genet.*, 10, 94-98.

Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S. and Shaw, D.J. (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genet.*, 4, 393-397.

Soong, B.W., Cheng, C.H., Liu, R.S., Shan, D. (1997). Machado-Joseph Disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Annals of Neurol.*, 41, 446-452.

Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1995). Simple tandem repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 3636-3641.

Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., et al. (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. et al. (1993) The gene for Machado-Joseph disease is mapped to chromosome 14q. *Nature Genet.*, 4, 300-304.

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, J. L. (1995)

Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378, 403-405.

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.

Verkerk, A.J.M.H., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.-H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F., Eussen, B.E., Van Omen, G.J.B., Galjaard, H., Caskey, C.T., Nelson, D.L., Oostra, B.A., & Warren, S.T. (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.

Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Z. & Lee C.C. (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隨運動失調症的分生研究.(中山醫學院醫學研究所碩士論文)

表 1

CAG trinucleotide repeat disease

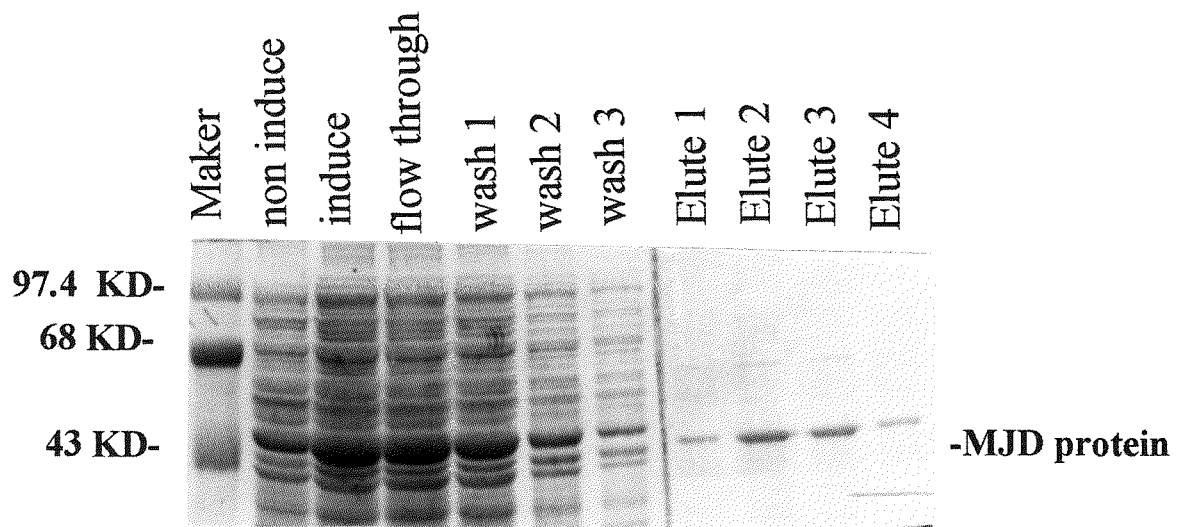
Disease	Sites of neuropathology	Repeat number		Gene product (intracellular localization)
		Normal	Disease	
Huntington's disease(HD)	striatum(medium spiny neurons)and cortex in late stage	6-35	36-121	Huntingtin (c)
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	Cerebellar cortex (purkinje cells), dentate nucleus and brainstem	6-39	40-81	Ataxin-1(n,c)
Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2)	Cerebellum, pontine nuclei, 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 MJD患者之淋巴母細胞株

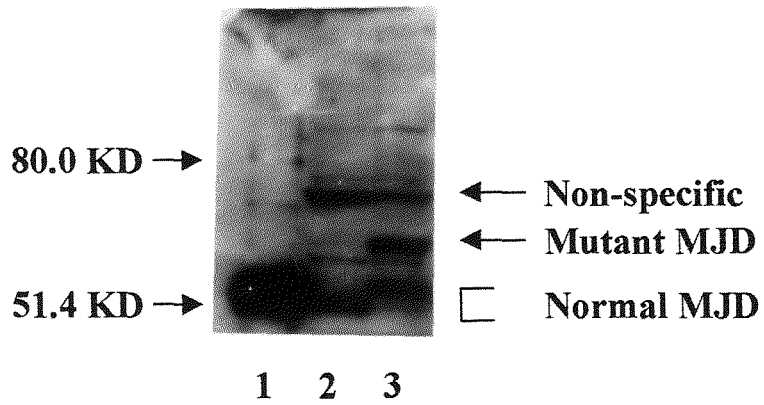
樣本編號	年齡	MJD基因中 CAG重覆次數	發病年齡
MJD001	40	23, 78	36歲
MJD002	23	26, 78	未發病
MJD003	26	15, 78	未發病
MJD004	30	16, 84	25歲
MJD005	6	16, 85	未發病
MJD006	46	25, 83	31歲

(摘錄楊千瑩碩士論文)



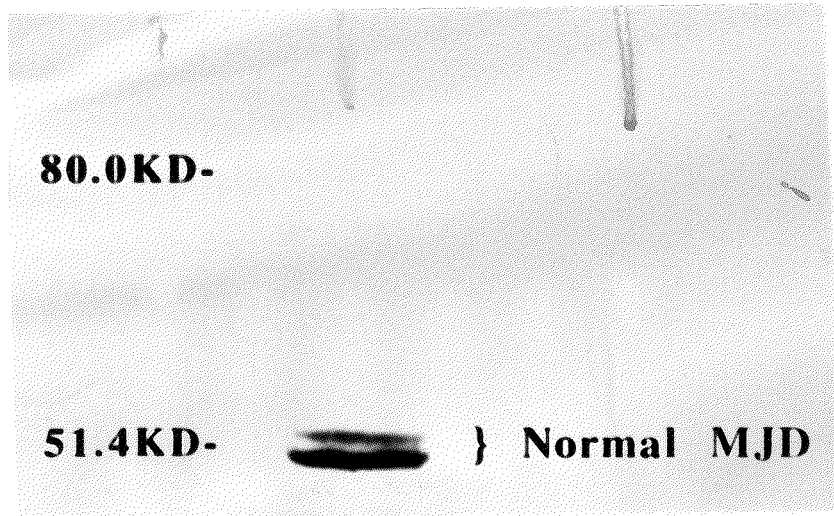
圖一 MJD蛋白經Ni-NTA resin純化

Anti-MJD polyclonal
antibody (1:100)

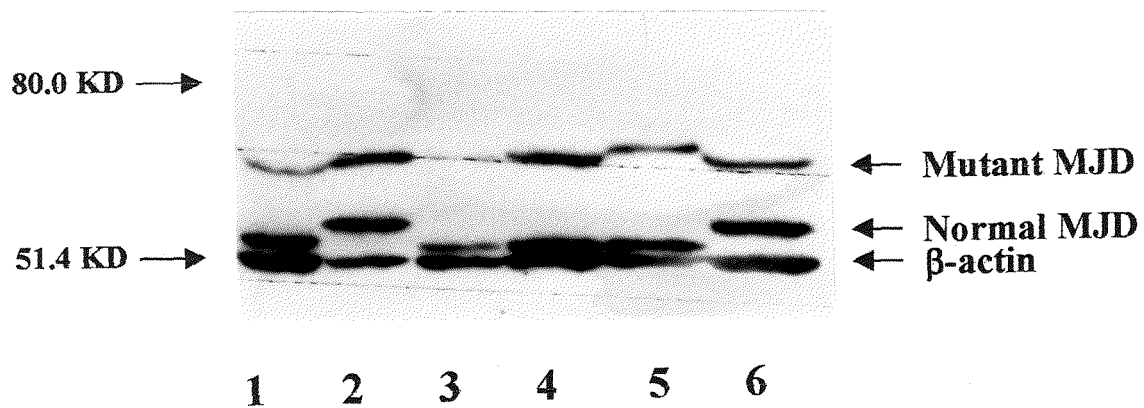


圖二 MJD 多株抗體偵測細胞中MJD蛋白

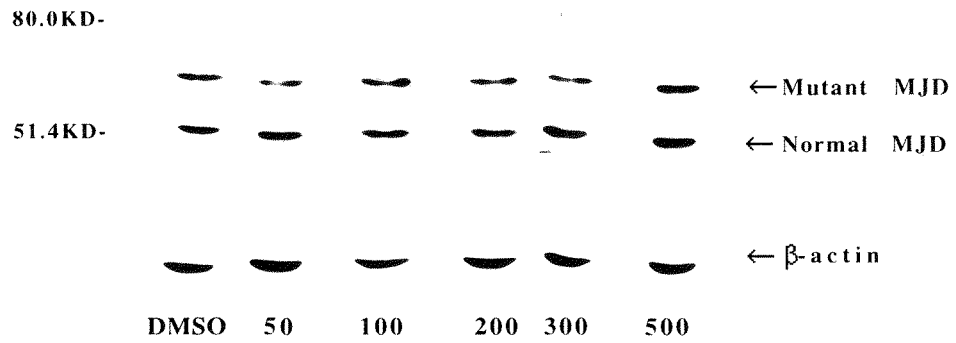
lane 1是MJD純化蛋白；lane 2是正常人淋巴母細胞；
lane 3是病人的淋巴母細胞。



圖三 利用MJD單株抗體偵測 正常人之淋巴母細胞
中MJD蛋白表現

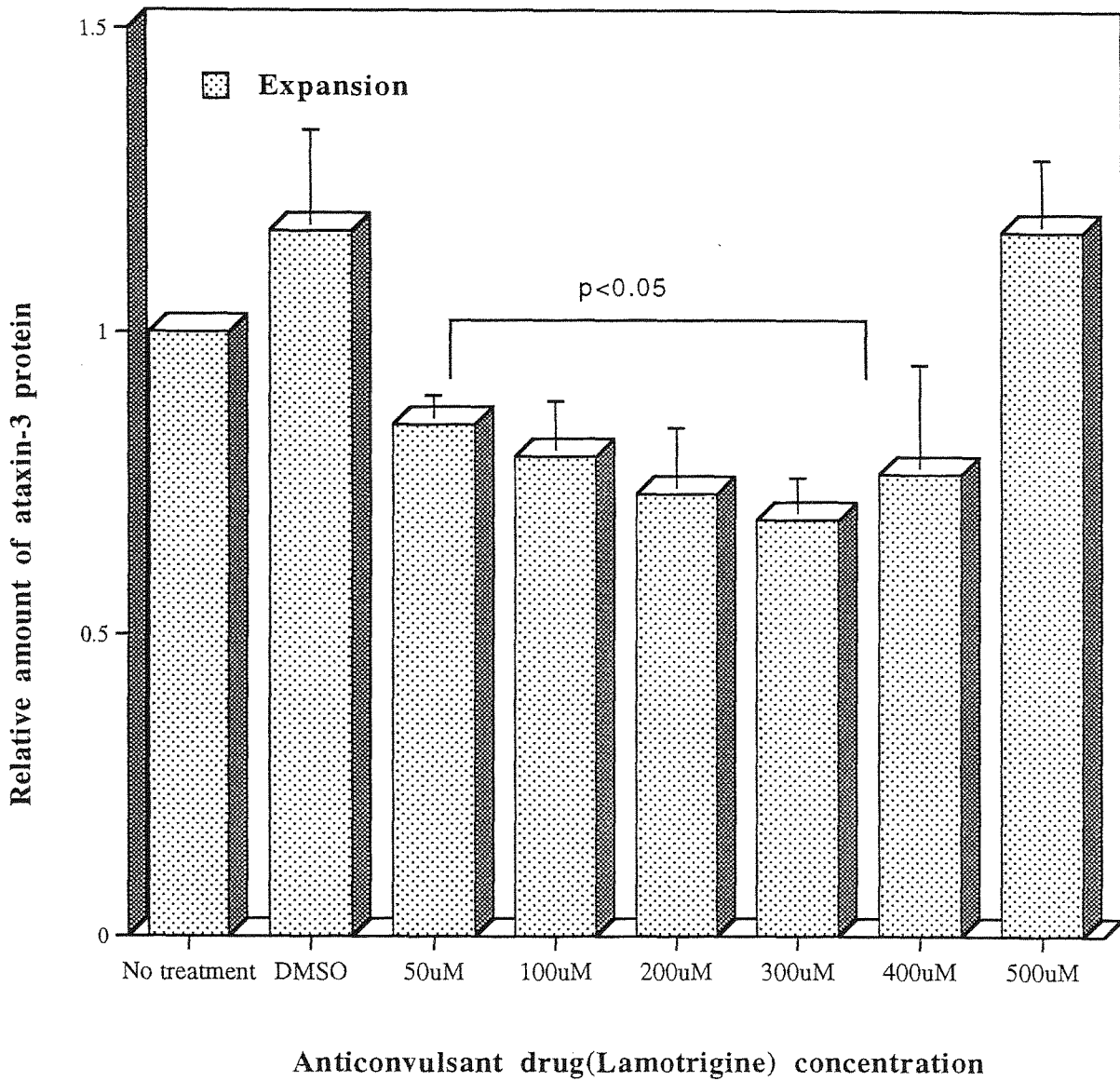


圖四 3個MJD患者及3個帶有MJD基因個體之淋巴母細胞
中MJD蛋白表現

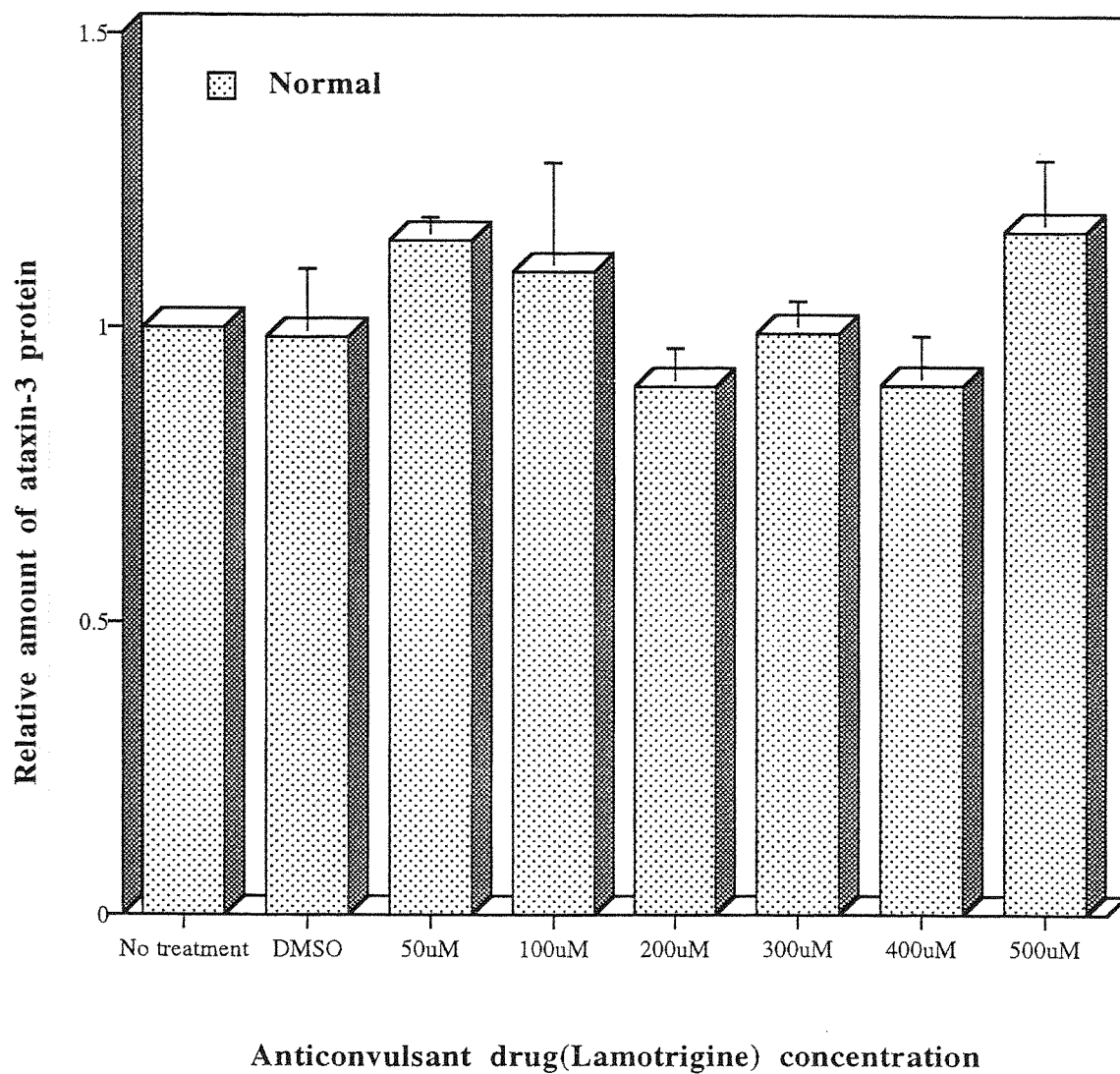


Anticonvulsant drug (Lamotrigine) concentration (μ M)

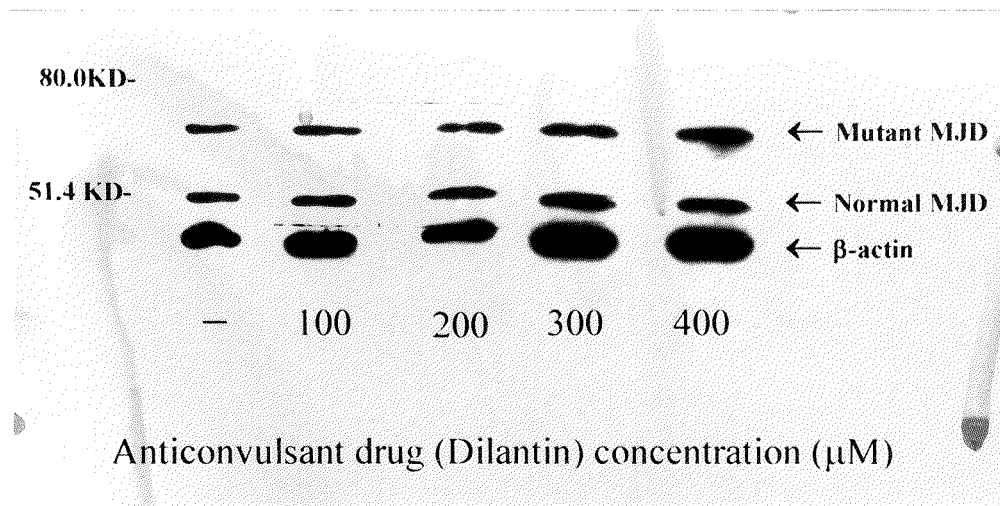
圖五 MJD006淋巴母細胞經由不同濃度lamotrigine處理48小時之後MJD蛋白的表現， β -actin為內部對照。



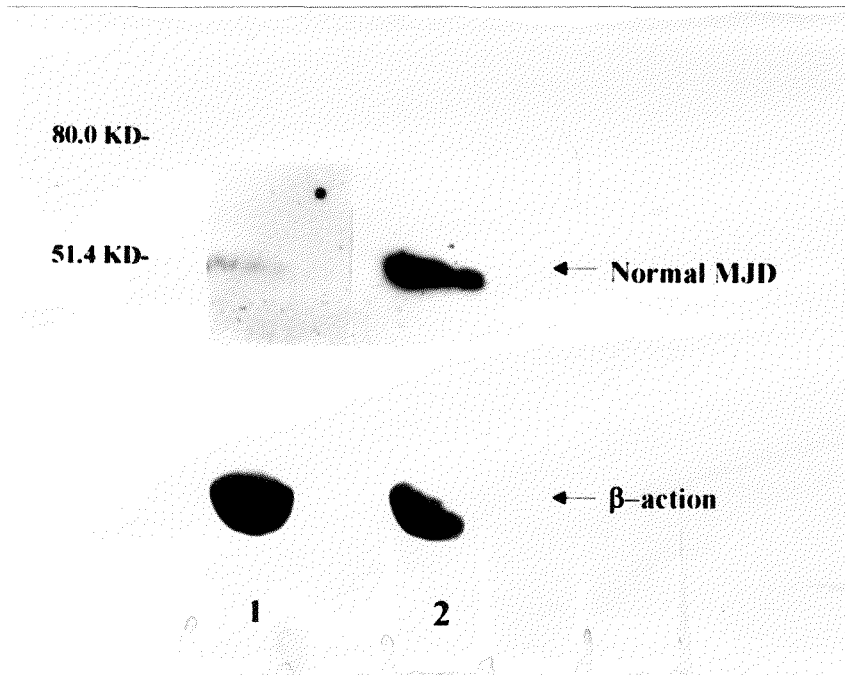
圖六 處理不同濃度 lamotrigine 48小時後，MJD006淋巴母細胞中倍增的MJD蛋白的表達。



圖七 處理不同濃度 lamotrigine 48小時後，MJD006淋巴母細胞中正常的MJD蛋白的表達。



圖八 MJD006淋巴母細胞經由不同濃度dilantin
處理48小時之後MJD蛋白的表現



圖九 週邊血液的MJD蛋白表現

lane 1是MJD患者週邊血液MJD蛋白

lane 2是正常人周邊血液正常MJD蛋白

附錄一、試藥

藥劑名稱	廠牌
Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)	Merck
Potassium Chloride	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Methol	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Tris	Merck
EDTA	Merck
NaCl	Merck
MgCl ₂	Merck
Sodium acetate	Merck
Sodium Chloride	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate	sigma
Sodium citrate	Merck
2-Propanol	Merck
Ethanol Absolute	Merck
Nonidet P-40	Sigma
Agarose (ultra pure)	BRL
TEMED	Sigma
Ampicillin	Sigma
Ammonium persulfate	Sigma
Glycerol	Sigma
Urea	Sigma
Sodium Bicarbonate	Sigma
RPMI	GIBCO BRL
DMEM	GIBCO BRL
PBS	GIBCO BRL
PSN	GIBCO BRL
Chloroform	MERCK
Formaldehyde solution	MERCK
Yeast extract	DIFCO
Phenol	Amresco
SDS	Bio-Rad
Glacial acetic acid	Merck
Ethidium Bromide	Sigma
Glycine	Bio-Rad
HCl	Merck

Acrylamide	BRL
PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride)	Sigma
EGTA	Sigma
Bradford	Bio-Rad
Tritone-100X	Sigma