

國立台灣師範大學生命科學系碩士論文

第八型脊髓小腦運動失調症：CTG 三核
苷重複的遺傳分析與細胞模式研究

Spinocerebellar Ataxia Type 8: Genetic Analysis of
CTG Trinucleotide Repeat and a Cell Model Study

研究生：洪 葦 苓

Wei-Ling Hung

指導教授：李 銘 亮 博士

Ming-Liang Li

李 桂 楨 博士

Guey-Jen Lee

中 華 民 國 九 十 四 年 六 月

致 謝

在研究所的第一年，因緣際會地接觸到罕見遺傳性疾病，讓我進入了一個未知卻又迷人的研究領域。這三年中，我想，學習到的不僅是實驗方面的技巧，更深刻體會到科學的真正精神——「有幾分證據，說幾分話」。也許，研究迷人之處就在於結果的不可預測，唯有不間斷地實驗並且保持一顆探究的心才是通往真知的唯一路徑。

這本論文的完成最先要感謝的是恩師李銘亮老師與李桂楨老師，您們在實驗方面給我的指導與建議，以及在生活上給與我的支持與關懷，讓我一路走來平順；感謝蘇銘燦老師偶有「天外飛來一筆」的建議，為 SCA8 的研究開啟了無限可能；感謝童麗珠老師、謝秀梅老師這段期間中給我的幫忙與關懷；感謝陳瓊美醫師適時給予指導與建議；也感謝林口長庚紀念醫院神經內科及中國醫藥大學附設醫院精神科提供血液樣本以供研究分析。

當然，這論文的完成也仰賴許多實驗伙伴的幫忙：感謝玄原、麗卿學姊、欣杰學長以及聖文，有你們辛苦累積的成果才讓我後續實驗得以順利進行；感謝瑞宏學長在實驗技巧上給我的指導；感謝政光學長的一席話，讓我找到未來的方向。感謝實驗室的大小同仁們——秀觀學姐、懿婷、玢璘、淑宜、霧茹、宜欣給我的支持與關懷；感謝玉青陪我渡過了難熬的補修課程；感謝國保、建智學長、慶孝學長、淑寧學姊、哲維學長、金祝、志宏學長、柏安學長、培菁、正康、文欽、銘儀、仁華、韋倫、佳薇、瑾妮、麗雪、四隻小龜及好友以蓁，因為有你們使我的研究生活平添更多色彩；更感謝承岳這一路的陪伴，為我的心靈注入一股暖流，是默默支持我的力量。

謹將這份論文獻給我最愛的家人們：爸爸、媽媽、阿婆、大舅、二阿姨、以及在天國的小舅，願你們和我一起分享這份喜悅。

註：於本人論文期間，感謝財團法人罕見疾病基金會提供獎助學金，使此論文順利完成。

目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	IV
英文摘要.....	V
圖表次.....	VII
壹、緒論	
一、脊髓小腦運動失調症(SCA).....	1
二、第八型脊髓小腦運動失調症(SCA8).....	2
三、SCA8 基因和 <i>KLHL1</i> 基因.....	5
四、肌強直萎縮症第一型(DM1).....	6
五、DM1 之致病假說	
(一) DNA 層次.....	7
(二) RNA 層次.....	8
六、研究動機與目的.....	9
貳、研究材料與方法	
一、血液樣品來源.....	11
二、基因組 DNA 的萃取.....	11
三、聚合酵素連鎖反應(PCR).....	12
四、基因型分析(Genotyping Analysis).....	12
五、自洋菜膠中純化 DNA 片段.....	12
六、接合反應(Ligation).....	13
七、轉形勝任細胞(Competent cell)之製備.....	13
八、細菌的轉形作用(Transformation).....	14
九、質體(Plasmid) DNA 的小量製備.....	15
十、DNA 定序(Sequencing).....	15
十一、質體(Plasmid) DNA 的大量製備.....	16
十二、SCA8 cDNA 重組質體之構築.....	17
十三、SCA8-ORF3 cDNA 重組質體之構築.....	18

十四、TBP-cDNA 與 36Q-cDNA 重組質體之構築.....	18
十五、SCA8-CTG _n 質體轉移作用(Transfection).....	19
十六、TBP 或 36Q 質體與 SCA8 質體共轉移作用.....	19
十七、流式細胞儀分析(FACS).....	20
十八、細胞之 total RNA 萃取.....	20
十九、細胞核、質之 RNA 萃取.....	21
二十、細胞 RNA 之穩定性(stability)分析.....	21
二十一、RT-PCR	22
二十二、RNA-FISH (RNA-fluorescence <i>in situ</i> hybridization).....	22
參、結果	
一、建立台灣不同族群 SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫.....	24
二、研究 SCA8 基因 CTG 擴增所造成的可能效應	
(一) FACS 分析 CTG 重複擴增對 SCA8 RNA 表現之影響....	24
(二) RT-PCR 分析 CTG 重複擴增對 SCA8 RNA 表現之影....	25
(三) CTG 重複擴增與 SCA8 RNA foci 形成.....	26
(四) SCA8 CTG 重複擴增對共轉之 TBP RNA 的影響.....	27
(五) SCA8 CTG 重複擴增對共轉之 36Q RNA 的影響.....	28
肆、討論	
一、建立台灣不同族群 SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫.....	29
二、研究 SCA8 基因 CTG 擴增所造成的可能效應	
(一) CTG 重複擴增對 SCA8 RNA 表現之影響.....	29
(二) CTG 重複擴增與 SCA8 RNA foci 形成.....	31
(三) CTG 重複擴增對(CAG) _n RNA 之反義效應.....	32
(四) SCA8 完整的 ORF3 可增強對(CAG) _n RNA 反義效應....	33
三、未來研究方向	
(一)改善重組質體轉移細胞之效率.....	34
(二) SCA8 RNA 對 TBP RNA 或 36Q RNA 之影響.....	35

(三) <i>SCA8</i> 表現與細胞凋亡之關聯.....	35
(四) <i>SCA8</i> 治療層面之細胞模式研究.....	36
伍、參考文獻	37
陸、附錄圖表.....	50

摘要

脊髓小腦運動失調症(spino-cerebellar ataxia; SCA)，為一群異質性的退化性神經疾病，大部分起因於三核苷重複擴增，患者在小腦、腦幹、脊髓及周邊神經系統等出現漸進式的退化。臨床上 SCA 不易分類，在多種相關的致病基因被分離後，分子檢測的建立及致病機轉的研究，有助於我們對這群疾病的了解。SCA8 和致病基因 3'端非轉譯區的 CTG 三核苷重複相關，除家族性及偶發性的運動失調患者外，在阿茲海默氏症(AD)、精神疾病症、帕金森氏症(PD)及其他類型之 SCA 患者中，甚至於極少數的正常人中，亦可見到異常的 CTG 三核苷重複(68 ~ 800 個)。本研究首先建立台灣正常人及上述退化性神經疾病患者，其 SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫，結果發現有 5 個擴增的 allele，分別來自 1 個 AD 患者、3 個 PD 患者與 1 個 SCA3 患者。擴增之 allele 經定序分析顯示包含 63 ~ 93 個三核苷重複。另一方面也構築含有不同 CTG 重複(0, 23, 88, 157 個)的 SCA8 cDNA 於表現載體上，轉移至人類胚胎腎細胞(HEK-293)或老鼠胚胎癌細胞(P19)，來研究 SCA8 可能之致病機轉。結果發現包含 0 個 CTG 重複之 SCA8 基因表現最好，當 CTG 重複 23-157 次時，SCA8 基因的表現量下降，但下降程度不隨 CTG 擴增而有明顯差異，且 RT-PCR 分析顯示 SCA8 mRNA 在細胞核、質的分布情形與穩定性均不受 CTG 重複次數影響。和第一型肌強直萎縮症(myotonic dystrophy type 1; DM1)一樣，擴增之 SCA8 RNA (CTG 重複 88 或 157 個)在核內會形成 RNA foci。而在 SCA8 和 TBP cDNA 或(CAG)₃₆ 之共轉實驗中，也發現 SCA8 對 TBP RNA 或(CAG)₃₆ RNA 有類似 antisense RNA 之作用。上述結果可幫助我們初步了解 SCA8 表現時其 RNA 可能造成之效應。

Abstract

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of neurodegenerative disorders caused mostly by trinucleotide repeat expansion. The patients with SCA undergo progressive degeneration in the cerebellum, brainstem, spinal cord, and peripheral nerve system. The clinical features of SCA are difficult to classify. With the identification of pathogenic genes, establishment of molecular testing and study of pathogenic mechanism could contribute to the understanding of these diseases. The expansion of 3' CTG trinucleotide repeat on chromosome 13q21 was shown to cause dominantly inherited SCA8. In addition to patients with familial and sporadic ataxia, expanded alleles can also be found in patients with psychiatric disorders, Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and with rare instances in the general population. In this study, the database of repeat size range in control subjects and in patients with SCA, PD, AD, and psychiatric disorders was set up. A total of 5 subjects with expanded allele were found, including one SCA, one AD, and three PD. DNA sequencing analysis revealed that these potentially pathogenic alleles had 65 ~ 92 combined repeats. To uncover the plausible pathogenesis, *SCA8* cDNA with 0, 23, 88 and 157 CTGs were cloned and transfected into human embryonic kidney 293 cells and mouse embryonic carcinoma P19 cells. Expression of reporter constructs containing a hrGFP gene downstream to *SCA8* cDNA revealed a *cis* effect of CUG repeats on the expression of *SCA8* transcripts. However, no apparent effect on *SCA8* mRNA levels was observed by RT-PCR analysis. RNA fluorescent *in situ* hybridization experiments revealed ribonuclear

foci only in cells carrying expanded repeats (88 and 157 repeats), similar to the study of myotonic dystrophy type 1 (DM1). Co-expression of *SCA8* and *TBP* or $(CAG)_{36}$ RNA revealed that *SCA8* RNA can function as antisense RNA to reduce the *TBP* or $(CAG)_{36}$ expression. This study helps to gain insight into the events involved in the pathogenesis of *SCA8* CTG expansion.

圖表次

圖一、各型 SCA 在世界上之盛行率.....	50
圖二、各型 SCA 其致病基因在分子層次上之分類.....	51
圖三、SCA8 與 <i>KLHL1</i> 基因輿圖.....	52
圖四、DM1 與 DM2 之致病基因.....	53
圖五、DM1 病人肌肉細胞核之 <i>DMPK</i> RNA foci.....	54
圖六、pEF-SCA8/(CTG) _n -hrGFP 重組質體與限制酶確認分析.....	55
圖七、pEF-SCA8/(CTG) _n 重組質體與限制酶確認分析.....	56
圖八、SCA8 ORF3 重組質體與限制酶確認分析.....	57
圖九、pCMV-TBP-EGFP、pCMV-36Q-EGFP 重組質體與限制酶確認 分析.....	58
圖十、正常人及 AD、PD、SCA、Schizophrenia 患者 SCA8 (CTG) _n 對 偶基因分佈.....	59
圖十一、FACS 分析 pEF-SCA8/(CTG) _n -hrGFP 表現情形.....	60
圖十二、RT-PCR 分析細胞核、細胞質中 SCA8 RNA 的分佈情形.....	61
圖十三、RT-PCR 分析 SCA8 RNA 的穩定性.....	62
圖十四、SCA8 之 CTG 擴增時在 P19 細胞中形成 RNA foci.....	63
圖十五、SCA8 之 CTG 擴增時在 HEK-293 細胞中形成 RNA foci.....	64
圖十六、FACS 分析 pCMV-TBP-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形.....	65
圖十七、FACS 分析 pCMV-36Q-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形.....	66
表一、各型 SCA 與其致病基因.....	67
表二、PCR 分析 SCA8 CTG 重複的引子對及條件.....	68
表三、RT-PCR 引子對及條件.....	69

表四、台灣地區正常人族群及阿茲海默氏症、帕金森氏症、小腦萎縮病、精神疾病等族群 SCA8 基因(CTG) _n 各對偶基因的頻率分佈.....	70
表五、SCA8 CTG 擴增片段的定序分析結果.....	71
表六、FACS 分析 pEF-SCA8/(CTG) _n -hrGFP 在 P19 細胞中表現情形.....	72
表七、FACS 分析 pCMV-TBP-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形.....	73
表八、FACS 分析 pCMV-36Q-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形.....	74

壹、緒論

一、脊髓小腦運動失調症(SCA)

脊髓小腦運動失調症(spino-cerebellar ataxia ; SCA)，一般簡稱為小腦萎縮症，是一種體染色體顯性遺傳的神經退化性疾病，只要有 SCA 致病之任一對偶基因就可能有發病的機會。SCA 成因可能是小腦內的神經細胞逐漸退化或萎縮，進而影響到行動的協調性，所以 SCA 患者會有漸進式的行動失調、步履蹣跚等共同症狀。目前 SCA 仍無有效的根治方法，僅能利用藥物或物理治療來減輕其症狀。目前分類出的 SCA 共有 22 型，包括 SCA1-8、SCA10-19、SCA21-23 和 SCA25 等，然而只有 9 型已確定致病基因的位置及成因，包括 SCA1-3、SCA6-8、SCA10、SCA12 及 SCA17 (表一)。由於 SCA 有高度異質性，在不同族群中各型 SCA 的盛行率也變異頗高(圖一) (Schols et al., 1997; Moseley et al., 1998; Saleem et al., 2000; Tang et al., 2000; Maruyama et al., 2002; Silveira et al., 2002; Bryer et al., 2003; Brusco et al., 2004; Schols et al., 2004)。大部份研究顯示 SCA3 是全世界最普遍之 SCA 類型；而 SCA1、SCA2、SCA6-8 的盛行率皆超過 2%，其餘類型的 SCA 則較罕見(盛行率低於 1%)，在台灣最常見的類型也是 SCA3 (Soong et al., 2001)。由於各型 SCA 有共同之臨床症狀，故難以單從臨床現象來區分，必須進一步作分子層次之診斷。

SCA 在分子層次上有一共同點，除了 SCA10 之外(是 ATTCT 五核苷重複擴增至 800 ~ 4000 個)，在致病基因中多為三核苷重複擴增 (Trinucleotide repeat expansion)，但各型 SCA 其三核苷重複之形態或區域也有差異(圖二) (Schols et al., 2004)。大部分類型的 SCA 以三核苷 CAG 為重複單位，CAG 可控制麩醯胺酸(glutamine，簡稱 Q)的合成，所以經由轉錄、轉譯出的蛋白質產物會包含一段多麩醯胺酸序列 (poly-Q tract)，在病人的腦部組織中可染到 poly-Q 蛋白質所累積形成的 inclusion，且多在細胞核中。此外，像是亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington's disease；HD)是研究最多的 poly-Q 疾病，研究發現 inclusion 中除了含突變的 poly-Q 蛋白質外，還包括 ubiquitin、proteasome、HSP70 (Heat shock protein 70)和轉錄因子等(Michalik and Van Broeckhoven, 2003)，細胞核中的 inclusion 可能會對神經細胞造成毒害(Perez et al., 1998; McCampbell et al., 2000; Yamada et al., 2001)，進而影響小腦功能而產生運動失調等症狀；然而有些研究顯示 inclusion 的形成可能扮演保護的機制(Ravikumar et al., 2004; Bowman et al., 2005)。

二、第八型脊髓小腦運動失調症(SCA8)

SCA8 在臨床上有發音困難、呼氣緩慢及步態失調等症狀，此外，

患者偶爾還伴隨著智能障礙。SCA8 發病年齡分布在 18 ~ 65 歲之間，平均值約為 39 歲，屬於晚發性之遺傳性疾病，故易將 SCA8 致病基因遺傳至子代中而造成家族性遺傳。在分子層次的研究上，已知 SCA8 基因位於染色體 13q21，於 1999 年由 Koob 等學者報導 SCA8 致病原因和 3'端非轉譯區(untranslated region ; UTR)的 CTG 重複擴增有關 (Koob et al., 1999)。此外，SCA8 基因常含有 CTA/CTG 複合重複序列 (CTA/CTG combined repeat ; CR)，常以 $(CTA)_{1-21}(CTG)_n$ 形式來表示 (Stevanin et al., 2000)。由此可知 CTA 與 CTG 重複有多型性 (Polymorphism)的現象，而且 $(CTA)_{1-21}$ 在遺傳上比 $(CTG)_n$ 具有更高的穩定性(Koob et al., 1999; Stevanin et al., 2000)，經由遺傳子代仍保有和親代相同的 $(CTA)_{1-21}$ 重複次數。正常族群在 SCA8 對偶基因中會有 16-92 個 CRs，其中 99%以上含有 16-37 個 CRs (n = 1200) (Stevanin et al., 2000)，而 SCA8 患者通常 CRs 數目會介於 100 ~ 250 個之間。此外從患者可觀察到 SCA8 基因會呈現不間斷的 CTG 重複序列，或是在基因中插入單個或多個 CCG、CTA、CTC、CCA、CTT 等情形發生(Ikeda et al., 2000; Schols et al., 2000; Silveira et al., 2000; Juvonen et al., 2002)。自 SCA8 被報導後，日本、英國、法國、芬蘭、巴西、美國、德國、義大利、西班牙和南斯拉夫等國在研究時也發現不同國籍的家族中，患者 SCA8 基因的 CTG 擴增數目差異性很大(Ikeda et al.,

2000a, 2000b; Juvonen et al., 2000, 2002; Moseley et al., 2000; Schols et al., 2000; Silveira et al., 2000; Cellini et al., 2001; Sobrido et al., 2001; Tazon et al., 2002; Topisirovic et al., 2002; Worth et al., 2000) , 因此 SCA8 之致病閾值(threshold)仍不確定。

此外，在不明原因的運動失調症(ataxia)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease ; AD)、精神疾病(psychiatric disorder)、帕金森氏症(Parkinson's disease ; PD)患者甚至正常人族群中亦可見到異常的 CTG 三核苷擴增(Juvonen et al., 2000; Pato et al., 2000; Silveira et al., 2000; Sobrido et al., 2001; Stevanin et al., 2000; Vincent et al., 2000a, 2000b; Worth et al., 2000; Tazon et al., 2002; Izumi et al., 2003) 。而在 SCA8 家族中，CTG 擴增不一定和疾病性狀共分離(co-segregation) (Koob et al., 1999; Day et al., 2000; Ikeda et al., 2000a; Juvonen et al., 2000; Stevanin et al., 2000; Cellini et al., 2001; Topisirovic et al., 2002) , 顯示 CTG 擴增和 SCA8 之間的關聯性還有待研究證實。特別的是，SCA8 基因中 CTG 重複次數會隨著子代的承傳而有所增減，顯示 CTG 重複的不穩定性。經由母系遺傳的 CTG 重複會有擴增現象(-11 ~ +600) , 有較強的疾病外顯性(penetrance)傾向，而來自父系遺傳的 CTG 重複則會有縮減情形發生(-86 ~ +7) , 疾病外顯性也相對減弱 (Silveira et al., 2000) 。由此可知，由母親遺傳而來的致病基因外顯性較高。此外 SCA8 也有 anticipation 的現象，當擴增的致病基因傳給子

代時，子代的發病年齡會較親代提早且病情也較為嚴重。

三、SCA8 基因和 *KLHL1* 基因

SCA8 基因的 mRNA 和 *KLHL1* (*Kelch-like 1*) 基因的 mRNA 在 5' 端的序列上有互補性(圖三) (Nemes et al., 2000)，推測其為 *KLHL1* 基因的一反義 RNA (antisense RNA)；*KLHL1* 基因和果蠅中的 *kelch* 基因在蛋白質結構上有高度相似性(homology) (Robinson and Cooley, 1997)，故以此命名。Kelch 蛋白質能和肌動蛋白(actin)結合，進一步形成果蠅中營養細胞(nurse cell)的環管(ring canal)，因而推測 *KLHL1* 基因的功能應與 *kelch* 基因類似，可藉結合肌動蛋白來維持細胞骨架完整。已知 *KLHL1* 基因產生的 KLHL1 蛋白質長達 748 個胺基酸，專一性表現在腦部組織，包括小腦在內，並會分泌至細胞質中行使功能 (Nemes et al., 2000)。若比對人類和老鼠 *SCA8* 和 *KLHL1* 的基因結構，這種互補的關係在演化上有高度之保留性(evolutionary conservation) (Benzow and Koob, 2002)，可知 *SCA8* 基因表現對正常生理機能的維持十分重要，可能是藉由調控 *KLHL1* 基因的表現量來達成。因此對於 *SCA8* 致病機轉有一推論如下：由於 *SCA8* 和 *KLHL1* 基因皆可表現在小腦，二者轉錄之 mRNA 在 5'端又有互補序列，因而部份 mRNA 分子可形成雙股結構，產生類似反義 RNA 的作用進而影響 KLHL1

蛋白質的轉譯，使得細胞骨架無法正常維持，小腦細胞可能萎縮或死亡而產生病徵。

四、肌強直萎縮症第一型(DM1)

除了 SCA8，CTG 擴增所造成的遺傳性神經退化疾病還包括肌強直萎縮症第一型(Dystrophia myotonica type 1；DM1)。肌強直萎縮症(Dystrophia myotonica；DM)是一種體染色體顯性遺傳之神經肌肉性疾病，包括 DM1 和 DM2 二型，不同的是 DM1 和三核苷 CTG 重複擴增有關；而 DM2 則和四核苷 CCTG 重複擴增有關(圖四)([Http://www.neurocast.com/site/content/sessions_05_2002.asp](http://www.neurocast.com/site/content/sessions_05_2002.asp))。由於 DM1 在新生兒之盛行率約為 1/8000，較 DM2 來得普遍，故前人研究多著重在 DM1。DM1 的臨床症狀甚多變異，主要是有肌強直(myotonia)的病徵，意指刺激肌肉後肌肉放鬆較為遲緩，由肌電圖可偵測到不正常之放電情形。此外，肌肉漸進式退化、心肌收縮病變、智能障礙、白內障、糖尿病、前額禿頭甚至於男性不孕等也是 DM1 之病徵。

DM1 是因 *DMPK* (Dystrophia myotonica-protein kinase)基因在 3' 端非轉譯區 CTG 三核苷擴增所導致(Strong and Brewster, 1997)。但和 SCA8 不同處是 *DMPK* 基因可轉錄轉譯出蛋白質，而 *SCA8* 基因轉錄出的 mRNA 雖然在 3'尾端有 polyA 的結構並有選擇性裁接(alternative

splicing)的現象，但之前研究因缺少 ORF (open reading frame)故推測沒有蛋白質產物。此外，在 DM1 患者的肌肉細胞內可染到 RNA foci 的形成(圖五) (Amack et al., 1999)，原因是帶有 CUG 擴增的 *DMPK* mRNA 會滯留在細胞核中，由於帶有許多 C、G 序列，彼此可鍵結形成雙股髮夾(hairpin loop)的二級結構，並聚積形成 RNA foci，這可經 RNA-FISH (RNA-fluorescent *in situ* hybridization)的技術來偵測。

五、DM1 之致病假說

DM1 早在 1992 年已被報導且相關研究甚多(Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992)，故可藉由瞭解 DM1 可能的致病機轉來推測 *SCA8* 的致病成因。下述為 DM1 致病的幾個主要假說，可從 DNA、RNA 二個層次來探討。

(一) DNA 層次：當 *DMPK* 基因的 CTG 擴增時，會增強核小體 (nucleosome)之組合進而促使異染色質的結構形成(Jansen et al., 1992; Wang et al., 1994; Wieringa, 1994; Boucher et al., 1995; Wang and Griffith, 1995; Harris et al., 1996)。另有研究證實在 DM1 中，三核苷重複之 3'端原為 DNaseI 之 hypersensitive 切位，但隨著三核苷重複擴增對 DNaseI 會較不敏感(Otten and Tapscott, 1995)，因此染色質結構愈緊密可能會直接影響鄰近基因的表現，如上游 *DMWD* 基因及下游 *SIX5* 基因，使其轉錄不易，導致二者表現量降低。研究發現在 DM1

病人中, *SIX5* RNA 無論在細胞質、核的表現量皆降低, 而 *DMWD* RNA 只在細胞質表現量有下降, 細胞核中表現則不受影響(Klesert et al., 1997; Thornton et al., 1997; Alwazzan et al., 1999; Korade-Mirnic et al., 1999), 因此 *DMPK* 之 CTG 重複擴增時的确會影響鄰近基因之表現。其中 *SIX5* 和果蠅的 *sine oculis* 基因同源, *sine oculis* 表現的蛋白質為一轉錄因子, 功能和果蠅眼睛發育有關, 且 *SIX5* 和 *DMPK* 在眼睛中皆會表現, 因此推測 *SIX5* 若表現量降低會影響眼睛發育。後續研究也證實在老鼠模式中, 若 *SIX5* 失去功能時會導致白內障(Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000), 和 DM1 的其一病徵相符。而在 *DMWD* 的研究中也推測若其功能喪失可能導致男性不孕、睪丸萎縮、失智等 DM1 病徵(Shaw et al., 1993; Jansen et al., 1995)。

(二) RNA 層次: CTG 擴增的 *DMPK* 基因會轉錄出含有 CUG 擴增的 mRNA, 可能和細胞中帶有(CAG)*n* 的 mRNA, 如 TBP (TATA binding protein)和轉錄因子 CBP 等, 因部分序列互補而產生似反義 RNA 現象(Sasagawa et al., 1999), 干擾其 RNA 穩定性或轉譯進行而間接影響其他基因的轉錄;此外 CUG 擴增的 *DMPK* mRNA 也可能形成髮夾二級結構而滯留在細胞核中(Davis et al., 1997; Koch and Leffert, 1998), 可增加和 muscleblind 截接因子的親和力, 使其滯留在核內的 RNA foci 中(Michalowski et al., 1999; Miller et al., 2000), 同時

也改變 CUG-BP(CUG binding protein)的活性，而影響其它基因 mRNA 的裁接作用(Miller et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Timchenko et al., 2001)；另一方面 *DMPK* mRNA 的雙股髮夾結構也會間接活化 PKP 蛋白磷酸酶(Tian et al., 2000)，參與細胞凋亡(apoptosis)的機制。

六、研究動機與目的

國外曾有報導在不明原因的運動失調症、阿茲海默氏症、精神疾病、帕金森氏症患者甚至正常人族群中亦可見到異常的 CTG 三核苷擴增。故首先建立台灣不同族群 *SCA8* 基因 CTG 重複的遺傳資料庫，包括正常人、阿茲海默氏症、帕金森氏症、精神疾病患者以及經診斷為 SCA 患者共五個族群，藉由聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)放大其 *SCA8* 基因中含 CTG 重複的片段，進行基因型分析。不僅能和國外的族群分析結果相比較，也能觀察不同族群中 *SCA8* 基因的 CTG 擴增情形，來探討這些疾病與 CTG 擴增之關聯性。

另一方面，雖然 *SCA8* 在分子診斷方面的研究甚多，然而詳細的致病機轉仍未知，故本論文另一重點是研究 *SAC8* 基因 CTG 擴增時造成的可能效應：首先由細胞模式研究 CTG 重複數目對 *SCA8* mRNA 表現的影響。構築 *SCA8*/(CTG)_n (n = 0, 23, 88, 157) cDNA 於表現載體 (expression vector)，並轉移(transfection)至細胞中表現，來檢測不同

CTG 重複時對 *SCA8* RNA 的表現、分布位置或穩定度有無影響；並用 RNA-FISH 的技術來觀察 *SAC8* CTG 擴增時是否和 DM1 一樣也有 RNA foci 的形成。最後將共轉人類 TBP cDNA 或含(CAG)₃₆ 質體與一系列含不同 CTG 重複數目之 *SCA8* 重組質體，來探討當 CTG 擴增時對細胞內含(CAG)_n 的 RNA 表現影響情形，藉此了解 *SCA8* 突變 RNA 可能影響的層面。

貳、研究材料與方法

一、血液樣品來源

經診斷為 AD 患者、PD 患者、精神疾病患者、其他類型 SCA 患者及正常人之血液樣品採集，均由病人或家屬同意，由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師及中國醫藥大學附設醫院精神科藍先元醫師提供。

二、基因組 DNA 的萃取

基因組 DNA 的萃取係採用 STRATAGENE DNA Extraction Kit。將 2 ~ 5 ml 的全血置於 15 ml 的離心管中，加入 Solution 1 至 15 ml，翻轉數次使之混合均勻。靜置於冰上 2 分鐘後，以 2,000 rpm 離心 5 分鐘以沉澱細胞核。去除上清液，加入 2 ml Solution 2 震盪以懸浮沉澱之細胞核。再加入 2 μ l 之 Pronase，於 37°C 作用隔夜或數天。待 Pronase 反應完成後，先置於冰上 10 分鐘，再加入 Solution 3，翻轉數次使之混勻後置於冰上 5 分鐘。再以 3,400 rpm 離心 15 分鐘，取上清液，加入 6 μ l RNase。置於 37°C 水浴 15 分鐘後，加入 2.5 ml 的異丙醇，翻轉數次直至 DNA 析出。將析出之 DNA 挑至另一 1.5 ml 離心管，以 70% 酒精洗去 DNA 析出物中的鹽類，風乾後溶於適量的 ddH₂O。以 OD₂₆₀ 吸光值測定 DNA 濃度，稀釋成 50 ng/ μ l 後置於 4°C

冰箱備用。

三、聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)

取 100 ng 的基因組 DNA，置於 25 μ l 的 PCR 反應中，以適當引子、條件進行(表二)，反應為放大包含有三核苷酸重複之片段。PCR 反應以熱循環儀(OmniGene，HYBAID)進行，之後以 1.8%洋菜膠體電泳檢查片段大小。

四、基因型分析(genotyping analysis)

取 1 μ l 的 PCR 產物，以 1：8 比例用水稀釋，再以聚丙烯醯胺膠體進行 Genotyping (MegaBACE 500，Amersham Biosciences Ltd.) (國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)，並利用 MegaBACE Analyzer 軟體分析比對基因型，推算出三核苷酸重複次數。

五、自洋菜膠中純化 DNA 片段

自 PCR 放大患者的 SCA 致病基因片段，經含 EtBr (0.25 μ g/ml) 的 1.8%洋菜膠電泳分離後，於紫外光下取出所要的片段，置於 1.5 ml 離心管中，進行膠體純化(Gel extraction kit，Viogene)。方法如下：加入 GEX buffer (500 μ l/50 ~ 300 mg 膠體)後置於 60 $^{\circ}$ C 乾浴器中 10 分鐘，待膠體溶解，再將溶液移至純化用之管柱內，以 14,000 rpm 離心

1 分鐘。除去離心下來之液體，加入 500 μl wash I buffer 至管柱中，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。除去離心下來之液體，加入 700 μl wash II buffer，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉離心下來的液體，加入 700 μl 的 70%酒精並以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，接著倒掉離心下來的液體，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘後，將管柱移至另一 1.5 ml 離心管中，加入 30 μl 的 ddH₂O，於室溫下靜置 10-30 分鐘，再以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，即完成純化的工作。最後取 2 μl 純化後的 DNA，以 1.8% 洋菜膠體進行電泳檢查。

六、接合反應(ligation)

在一 5 μl 接合反應中，取 0.5 μl (50 ng) pGEM-T Easy 載體 (Promega)，加入適量上述純化的 DNA 片段、0.5 μl (3U) T4 DNA ligase 及 0.5 μl 10X buffer (300 mM Tris-HCl pH7.8 – 100 mM MgCl₂ – 100 mM DTT – 10 mM ATP)，混合均勻後置於 16°C 作用隔夜，待隔日作用完成後將反應置於熱循環儀中以 70°C 作用 10 分鐘，終止 T4 DNA ligase 作用，並迅速置於冰上。

七、轉形勝任細胞(competent cell)之製備

接種大腸桿菌 TOP-10F' (Invitrogen) 一個菌落到 1 ml 含四環黴素 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 之 Luria Bertani (簡稱 LB) 培養液中 (1% tryptone – 1%

NaCl – 0.5% yeast extract), 於 37°C、250 rpm 震盪隔夜培養後，倒入 100 ml LB 培養液中繼續培養 3 ~ 4 小時($OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$)。置於冰上 10 分鐘後，以 4°C、3,000 rpm 離心 5 分鐘沉澱細胞。倒除上清液再加入 20 ml 預冷過濾之 0.1M $CaCl_2$ 以懸浮細胞。冰浴 10 分鐘後，以 4°C、3,000 rpm 再離心 5 分鐘沉澱細胞。倒除上清液，加入 2.5 ml 含 16% 甘油之 0.1 M $CaCl_2$ ，輕敲管壁以懸浮細胞，即完成可用之轉形勝任細胞。分裝成每管 100 μ l 後，測定期轉形效率達 1×10^7 菌落/ μ g pGEM4 DNA 以上，即可置於 -70°C 保存備用。

八、細菌的轉形作用(transformation)

將保存於 -70°C 之轉形勝任細胞(competent cells)置於冰上解凍，在 100 μ l 的細胞中加入 5 μ l 前述已完成接合反應之重組質體 DNA，混合均勻後置於冰上 30 分鐘；再置於 42°C 水浴中熱休克 45 秒。置冰上 2 分鐘後加入 900 μ l LB 培養液，於 37°C 中培養 40 分鐘到 1 小時。再加 100 μ l 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal, 20 mg/ml in dimethylformamide) 及 100 μ l isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG, 200 mg/ml)，混合均勻後各吸取 200 μ l 至每盤含 50 μ l/ml 青黴素之 LB 培養基中，以滅過菌的玻棒將菌液塗抹均勻，培養 16 ~ 18 小時。

九、質體(plasmid) DNA 的小量製備

以牙籤挑選出前述轉形作用生長出的白色單一菌落，劃在含 ampicillin 之培養基中保留菌種，同時並置於含 ampicillin 的 1 ml 培養液的 1.5 ml 離心管內，於 37°C、250 rpm 震盪培養 6 ~ 8 小時或隔夜後，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，除去上清液。以鹼性溶菌法分解細菌，抽取質體之 DNA。其方法如下：加入 70 μ l solution I (50 mM glucose – 25 mM Tris-HCl pH8.0 – 10 mM EDTA pH8.0)，劇烈震盪以懸浮菌液；再加入 140 μ l 新鮮配置的 solution II (0.2 N NaOH – 1% SDS)，輕微地翻轉離心管數十次之後，加入 105 μ l solution III (3M potassium acetate)，再輕微地翻轉離心管數十次後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，即可見白色的核酸沉澱物。去除上清液，以 70%酒精洗去多餘的鹽類。風乾後，加入 30 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 ddH₂O 於沉澱物中，37°C 水浴至少 10 分鐘助核酸溶解，最後取 2 μ l 進行 0.7%洋菜膠體電泳分析。挑選出有插入 DNA 片段的質體後，進一步以限制酵素檢查其插入片段是否正確。

十、DNA 定序(sequencing)

挑選出有插入 DNA 片段的質體，定序(MegaBACE 500，Amersham Biosciences Ltd.) (國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)以

直接計算其三核苷酸重複次數，並比較是否與 genotyping 分析結果符合。

十一、質體 DNA 的大量製備

經限制酶分析確認之重組質體菌落培養於含青黴素的 1 ml 培養液中，37°C、250 rpm 震盪培養 2 小時以上，倒入 65 ml 含青黴素的培養液，繼續培養 20 小時。之後利用 Viogene Ultrapure Plasmid Midiprep System (Midiprep-V100) 進行質體 DNA 的大量製備及純化。方法為：將 65 ml 的菌液均分裝於兩個 50 ml 的有蓋離心管中，以 8,000 rpm 離心 5 分鐘，棄除上清液後每管加入 2 ml 的 buffer VP1 並劇烈震盪懸浮細菌，將兩管打散的菌液合併為一管，加入 4 ml 的 buffer VP2，溫和的翻轉離心管數十次，再加入 4 ml 的 buffer VP3，翻轉離心管數十次後於冰上作用 5 分鐘。之後利用 12,000 rpm 離心 20 分鐘，離心時將 Midiprep-V100 column 置於 50 ml 新的離心管中，加入 5 ml 的 buffer VP4，經重力作用讓溶液通過管柱後棄去濾液。之後將前述離心後的上清液倒入 Midiprep-V100 column 中，經重力作用讓菌液通過管柱後棄除濾液，再以 12 ml 的 buffer VP5 清洗管柱，亦利用重力作用讓菌液通過管柱後棄除濾液。之後將管柱移至另一個新的離心管中，加入 5 ml 的 buffer VP6，利用重力讓溶液通過管柱將 DNA 沖洗

出，即得含有質體 DNA 的沖洗液。再加入 3.75 ml 的異丙醇溫和的混合後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，即可看到白色的 DNA 沉澱物。去除上清液，加入 400 μ l 的 ddH₂O 溶解 DNA，並加入 20 μ l 的 5 M NaCl 及 2~3 倍體積之 100%酒精，混合後轉移至 1.5 ml 微量離心管，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘以沉澱質體 DNA，再以 70%酒精清洗鹽類。風乾後將 DNA 溶於 400 μ l 的 ddH₂O 中，以 OD₂₆₀ 吸光值測定 DNA 濃度，即完成質體 DNA 的大量製備。

十二、SCA8 cDNA 重組質體之構築

將選殖於 pGEM-T Easy 載體上的野生型(CTG)₂₃ (由博士班研究生林玄原完成)及擴增突變[(CTG)₈₈、(CTG)₁₅₇] (由碩士班研究生項聖文完成)的 SCA8 cDNA，以 *NotI* 限制酶切下後，置入真核表現載體 pEF-IRES-hrGFP 的 multiple cloning site (MCS)，即可得到由 EF (elongation factor) 啓動子驅動 SCA8 cDNA 基因的 SCA8/(CTG)_n (n = 23, 88, 157) 重組質體。再以 *DraI* 限制酶切割 SCA8/(CTG)₂₃ 質體，去除 SCA8 含有 CTG 重覆區域，即可得到 SCA8/(CTG)₀ 的重組質體(圖六)。以上的四個重組質體在 SCA8 基因下游含有 IRES-hrGFP 基因，表現綠螢光蛋白可用來間接偵測 SCA8 的表現。另一方面，以 *kpnI* 限制酶切割以破壞 pEF-IRES-hrGFP 載體中的綠螢光基因，以構築另一組不表現綠螢光蛋白的 SCA8 cDNA 重組質體，可用於 RNA-FISH

的實驗及和人類 TBP 基因共轉之實驗，以避免綠螢光蛋白之干擾；完成的上述重組質體以適當之限制酶切割，進行圖譜分析確認(圖七)。

十三、SCA8-ORF3 cDNA 重組質體之構築

由 pUAST-ORF3/(CTG)_n (n = 88, 157) (由碩士班研究生項聖文完成)的表現質體上，經定序分析其轉譯起始點 ATG 的 A 缺失，故無法正常轉譯出 SCA8 的 ORF3，以 *EcoRI* 及 *XhoI* 限制酶切下僅帶有 SCA8 ORF3/CTG_{88/157} 等二個片段，並置入真核表現載體 pEF-IRES-hrGFP 的 multiple cloning site 中，即可得到由 EF 啓動子驅動 SCA8 的 ORF3/(CTG)_n (n = 88, 157)重組質體，並以 *kpnI* 酵素切割以破壞載體中的綠螢光基因，以構築不表現綠螢光蛋白的 SCA8-ORF3/(CTG)_n (n = 88, 157)重組質體；完成的上述重組質體以適當之限制酶切割，進行圖譜分析確認(圖八)。

十四、TBP cDNA 與 36Q 重組質體之構築

將選殖於 pGEM-T Easy 載體上的人類野生型 TBP (含 36Q) cDNA (由博士班研究生李麗卿完成)，以 *EcoRI* 限制酶切下後，置入真核表現載體 pIRES2-EGFP 的 MCS 中，即可得到由 CMV 啓動子驅動 TBP cDNA 基因的 TBP/36Q 重組質體，並以綠螢光蛋白作為 reporter 來偵測 TBP 的表現。再以 *PstI* 限制酶作切割以去除大部份 TBP cDNA，

保留 CAG 重覆部分，可得到無正常 TBP 功能但仍保留 CAG 重覆部分的重組質體，在和 SCA8 cDNA 共轉實驗中可去除 *TBP* 對細胞造成之影響。完成的上述重組質體以適當之限制酶切割，進行圖譜分析確認(圖九)。

十五、SCA8/(CTG)_n 質體轉移作用(Transfection)

利用脂質試劑 Lipofectamine2000 (Invitrogen)將表現載體轉入 P19 細胞或 HEK-293 細胞中。轉染前一天，先將 $2 \sim 4 \times 10^5$ 個細胞置於 12 孔盤(12-well)的細胞培養盤待用，用 100 μ l 的 α MEM 或 DMEM(不含血清)先稀釋 1.5 μ g 的 DNA，再與以 100 μ l 的 α MEM 或 DMEM 稀釋後的 Lipofectamine 2000 混合後，在室溫下靜置 25 分鐘，使 Lipofectamine 2000 與 DNA 形成 Lipofectamine 2000-DNA 的複合物。再取 200 μ l 的 Lipofectamine 2000-DNA 複合物加入每個孔盤中，在 37°C、5%CO₂ 培養約 48 小時後，取細胞作後續分析。

十六、*TBP* 或 36Q 質體與 SCA8 質體共轉移作用

利用脂質試劑 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)將表現載體轉入 HEK-293 細胞中。轉移前一天，先將 4×10^5 個細胞置於 12 孔盤的細胞培養盤待用，用 100 μ l 的 DMEM(不含血清)先稀釋 1.5 μ g 的質體 DNA (*TBP* 或 36Q 與 SCA8 質體的比例依次為 1 : 1、1 : 3、1 : 5、1 :

7，二者質體總量共 1.5 μg ），再與以 100 μl 的 DMEM 稀釋後的 Lipofectamine 2000 (含 4 μl Lipofectamine 2000)混合後，在室溫下靜置 25 分鐘，使 Lipofectamine 2000 與 DNA 形成 Lipofectamine 2000-DNA 的複合物。再取 200 μl 的 Lipofectamine 2000-DNA 複合物加入每個孔盤中，在 37°C、5% CO₂ 培養約 48 小時後，取細胞以流式細胞儀分析綠螢光蛋白表現量。

十七、流式細胞儀分析(FACS)

培養人類胚胎腎細胞 HEK-293 或小鼠胚胎癌細胞 P19，以 Lipofectamine 2000 轉移含有綠螢光蛋白之重組質體。轉移 48 小時後，以流式細胞儀(FACStar flow cytometer, Becton-Dickinson)收一萬個細胞去量化綠螢光蛋白表現，平均每一個樣品重覆取三次細胞來分析。以未轉移質體 HEK-293 或 P19 細胞作校正，以偵測到綠螢光蛋白之細胞百分比乘上綠螢光蛋白平均表現強度，作為綠螢光蛋白平均表現量，並取特定質體綠螢光蛋白表現量作為 100%基準值，再換算出其他組之相對表現量作分析比較。

十八、細胞之 total RNA 萃取

P19 細胞經轉移後約 48 小時，去除培養液，以 PBS 清洗二次後，加入 200 μl Trizol (Sigma)反應並吸放細胞數次再轉至 eppendorf 中加

入 20 μ l 之 chloroform 倒轉混合 30 次，在冰上反應 5 分鐘，以 4°C 冷凍離心 12,000 rpm、15 分鐘後，取上清液(含細胞 RNA)至新 eppendorf，加入等體積之異丙醇倒轉混合 30 次，置於-70°C 下 30 分鐘以上析出 RNA。再 4°C 冷凍離心 12,000 rpm、15 分鐘，去上清液，加入 200 μ l DEPC-水溶解 RNA，再加 10 μ l 5 M NaCl、600 μ l 99.5% 酒精並倒置混勻，再置於-70°C 約 30 分鐘，以 4°C 冷凍離心 12,000 rpm、10 分鐘，去上清液，以 70% DEPC-酒精清洗後，去除殘餘酒精並烘乾，最後加入適當之 DEPC-水溶解 RNA 並定量。

十九、細胞核、質之 RNA 萃取

P19 細胞經轉移後約 48 小時，去除培養液，以 PBS 將細胞打散懸浮吸至 eppendorf 中，離心 14,000 rpm、1 分鐘沉澱細胞，去上清液，加入 200 μ l 含 0.5% NP-40 之 lysis buffer，在冰上反應 10 分鐘打破細胞，再離心 14,000 rpm、1 分鐘沉澱細胞核，取上清液(含細胞質)至新的 eppendorf，原管殘留的白色沉澱物即為細胞核，分別加入 Trizol 反應與 chloroform 抽取轉移細胞的細胞核、細胞質之 RNA(方法同抽取細胞之 RNA)，經定量分析，以 *SCA8* 或 *neomycin* 之引子對(表三)進行 RT-PCR。

二十、細胞 RNA 之穩定性(stability)分析

P19 細胞經轉移後 44 小時，加入 actinomycin D (10 μ l/ml)於培養液中，以此點作為 0 小時，之後經 8, 16, 24 小時後分別收細胞，再以 RNazol B 抽取細胞內 RNA(方法同十八)，定量 RNA 後再以 RT-PCR 分析 RNA 表現情形。

二十一、RT-PCR

將定量後之細胞 RNA，各取 500 ng 利用 SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen)作 RT-PCR 反應。先在 10 μ l 的反應中加入 500 ng RNA、10 mM dNTP 1 μ l、oligo(dT)₂₀ primer 1 μ l，再補 DEPC-H₂O 至 10 μ l。在 65°C 下反應 5 分鐘後置冰上 1 分鐘以上，再加入 2 μ l 10X RT buffer、4 μ l 25 mM 的 MgCl₂、2 μ l 0.1 M DTT、1 μ l RNase OUT 及 1 μ l SuperScript III (共 10 μ l)混合均勻，經 50°C 反應 50 分鐘再行 85°C 5 分鐘後，加入 RNase H 1 μ l 在 37°C 水浴槽中反應以分解 RNA，之後取適量 cDNA 及引子對作 PCR 反應(表三)，以檢測 RNA 表現情形。

二十二、RNA-FISH (RNA-fluorescence *in situ* hybridization)

培養 HEK-293 或 P19 細胞在蓋玻片上，24 小時後以脂質試劑分別轉移入 EF 啟動子驅動且破壞綠螢光蛋白的 SCA8/CTG_n(n = 0, 23, 88, 157)重組質體。轉移 48 小時後，以含 4% formaldehyde/10%醋酸

之 PBS 在室溫下固定 10 分鐘，以 PBS 洗去殘留液，加入 70%酒精在 4°C 下打洞至少 24 小時，再以 50% formamide/2X SSC 與細胞反應 10 分鐘後，在 100 μ l 雜合液中(50% formamide/2X SSC/10% dextran sulfate/2mM VAC/0.02% BSA/ 1mg/ml *E coli* tRNA) 與 50 ng CY3-conjugated (CAG)₁₀ probe(Operon)進行雜合反應，經 37°C 下反應二小時，並用 50% formamide/2 X SSC 在 37°C 下清洗 3 次，每次 20 分鐘，最後加入 DAPI 染劑作細胞核染色，並以固定液(phenyldiamine in 90% glycerol)將染色後細胞固著在載玻片上，以共軛焦顯微鏡觀察 RNA foci 及 DAPI 表現。

參、結果

一、建立台灣不同族群 SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫

目前已對 166 位正常人(332 個對偶基因)、139 位阿茲海默氏症患者(278 個對偶基因)、244 位帕金森氏症患者(488 個對偶基因)、95 位精神疾病患者(190 個對偶基因)以及 94 位經診斷為其他類型之 SCA 患者(188 個對偶基因)進行 SCA8 之基因型分析，結果顯示這些族群中 CTG 重複數目 97%以上多分布在 18~33 個之間(表四、圖十)，其中以 18 個 CTG 重複所佔比例最高(正常人佔 28.61%，阿茲海默氏症患者佔 25.54%，帕金森氏症患者佔 30.94%，其他類型之 SCA 患者佔 20.74%，精神疾病患者佔 24.21%)，並發現有 5 個對偶基因有 CTG 擴增情形，包括 1 個 AD 患者(63 個 CTG 重複)、3 個 PD 患者(84, 88, 92 個 CTG 重複)及 1 個 SCA3 患者(65 個 CTG 重複)，其 CTG 重複數目部分經定序分析(表五)。

二、研究 SCA8 基因 CTG 擴增所造成的可能效應

(一) FACS 分析 CTG 重複擴增對 SCA8 RNA 表現之影響

首先以細胞模式研究 SCA8 基因 CTG 擴增對其 mRNA 表現的影響。先從正常人中構築 23 個 CTG 重複之 SCA8 cDNA 至 EF 啟動子驅動之質體中(可廣泛表現於各類型細胞中)，作為正常範圍之重複個

數；在帕金森氏症患者中構築 CTG 擴增至 88 個的 *SCA8* cDNA 於同啓動子之質體中，再以人為擴增將 CTG 重複增至 157 個，另以 *DraI* 去除 CTG 重複部份，以建立不含 CTG 重複之 *SCA8* 重組質體。首先初步轉入 P19 細胞中以螢光顯微鏡觀察綠螢光蛋白表現，可間接偵測 *SCA8* 表現情形，再以細胞流式儀量化分析，結果顯示各 pEF-*SCA8*/(CTG)_n-hrGFP (n = 0, 23, 88, 157)重組質體在 EF 啓動子驅動下皆可表現綠螢光蛋白。轉入 *SCA8*/(CTG)_n (n = 23, 88, 160)重組質體的細胞其綠螢光蛋白表現較轉入 *SCA8*/(CTG)₀的細胞來得低，表示當有 CTG 重複存在於 *SCA8* cDNA 中，會降低 *SCA8* 在細胞的表現情形(約降低 38% ~ 46%)；另一方面可觀察到 *SCA8*/(CTG)_n (n = 23, 88, 160)重組質體三者的綠螢光蛋白表現量無明顯差異(分別為 54.69%、54.69%及 62.5%)，表示 CTG 重複數目對 *SCA8* 表現影響不大(表六、圖十一)。

(二) RT-PCR 分析 CTG 重複擴增對 *SCA8* RNA 表現之影響

由於單從流式細胞儀檢測 *SCA8* 表現結果是間接的，故進一步以 RT-PCR 的方式偵測 *SCA8* mRNA 表現情形及在細胞核、質中之分布。將 pEF-*SCA8*/(CTG)_n (n = 23, 88, 157)重組質體轉入 P19 細胞中，二天後分別收細胞核、質中 RNA，經 RT-PCR 檢測 *SCA8* mRNA 表現。結

果可知無論 CTG 重複有無擴增，對 *SCA8* mRNA 表現並無顯著影響。

另外 *SCA8* mRNA 在細胞核或細胞質中分布比例約相等(圖十二)。

進一步我們檢測 CTG 重複擴增對 *SCA8* mRNA 穩定度的影響，在 P19 細胞中分別轉入 pEF-*SCA8*/(CTG)_n (n = 23, 157)重組質體，2 天後加入 actinomycin D(10 μl/ml)於細胞培養液中，可抑制 RNA 之新合成，藉此觀察已轉錄 RNA 的降解(degradation)情形。以 actinomycin D 處理時作為 0 小時，經 8, 16, 24 小時後分別收細胞，再萃取細胞內 RNA，以 RT-PCR 分析 *SCA8* RNA 表現情形。結果得知加入 actinomycin D 後 *SCA8* RNA 的量會隨著時間而遞減，0 小時 RNA 量最高，而 24 小時後 RNA 量大幅降低。另可發現不論是正常的 *SCA8*/(CTG)₂₃ 或是擴增至 *SCA8*/(CTG)₁₅₇，其 *SCA8* RNA 降解情形無明顯差異(圖十三)。綜合上述結果可知 CTG 重複擴增時對 *SCA8* RNA 的生成量、在細胞核、質分布或是 RNA 的穩定度皆無明顯影響。

(三) CTG 重複擴增與 *SCA8* RNA foci 形成

另一方面，在 DM1 病人中可發現肌肉細胞之細胞核中有 *DMPK* RNA foci 形成，相對應本研究主題也是 CTG 擴增所導致的疾病，因此我們也檢測當 CTG 擴增時，在細胞核中是否可偵測到 *SCA8* RNA foci。從 P19 細胞的實驗中得知當轉入含有 CTG 擴增之 *SCA8* 重組質

體時(CTG₈₈ 與 CTG₁₅₇)，細胞核內才有 RNA foci 形成；而無 SCA8 cDNA 之空質體或是正常含 CTG₂₃ 之 SCA8 質體表現時，皆觀察不到 RNA foci 形成，這和 DM1 的研究結果相符。此外也發現當 CTG 重複擴增至 157 個時，核內的 RNA foci 數目也多於只擴增至 88 個(圖十四)；另在 HEK-293 細胞中重覆該實驗也得到相同結論(圖十五)。

(四) SCA8 CTG 重複擴增對共轉之 TBP RNA 的影響

由於 CTG 重複擴增經轉錄後會產生較長的 CUG 重複，可能會和細胞中正常存在含 CAG_n 的 RNA 作用，因序列部份互補產生類似反義 RNA 的作用，而影響這些 RNA 的穩定度或是後續之轉譯。故我們以人類廣泛表現的 TBP 基因作為標的(target)，先構築正常 CAG 重複範圍的 TBP/CAG₃₆ cDNA 於含 EGFP 的重組質體上，再去除 CAG 重複後大部份之序列，可得到 CAG₃₆ 的重組質體(即 36Q)，以避免 TBP 本身功能對實驗的干擾，再將二組質體分別和一系列不同 CTG 重複數目之 SCA8 重組質體共轉至細胞中，藉由間接檢測 EGFP 表現來探討 CTG 擴增時對 TBP RNA 或 36Q RNA 的影響。經 FACS 分析結果可知當 SCA8 含有 CTG 重複時(CTG 重複 23 個)，就會降低 TBP RNA 的表現(降低約 20% ~ 44%)，且 CTG 擴增數目愈多(CTG 重複 88 個或 157 個)對 TBP-RNA 的影響程度也愈大(降低約 32% ~ 52%)；而當

SCA8 之重組質體轉入之比例愈高時，這種類似反義 RNA 的效應也愈顯著。另一方面，當和 SCA8 ORF3/CTG_{88/157} (主要包含 ORF3 CTG 重複區域)重組質體共轉時，對 TBP RNA 也有類似 antisense 之影響，會降低 TBP RNA 之表現量(降低約 14% ~ 33%)，且 CTG 擴增至 157 個時會較擴增至 88 個還顯著(表七、圖十六)。

(五) SCA8 CTG 重複擴增對共轉之 36Q RNA 的影響

在和 36Q-cDNA 共轉的實驗中，也可得到類似之結果(表八、圖十七)。當 SCA8 含有 CTG 重複時(CTG 重複 23 個)，就會降低 36Q-RNA 的表現(降低約 19% ~ 36%)，且 CTG 擴增數目愈多(CTG 重複 88 個或 157 個)對 36Q RNA 的影響程度也愈大(降低約 36% ~ 53%)；而當 SCA8 之重組質體轉入之比例愈高時，對 36Q RNA 的影響也愈顯著。另一方面，當和 SCA8 ORF3/CTG_{88/157} (主要包含 ORF3 之 CTG 重複區域)重組質體共轉時，對 36Q RNA 也有類似 antisense 之影響，會降低 36Q RNA 之表現量(降低約 11% ~ 43%)，且 CTG 擴增至 157 個時會較擴增至 88 個還顯著。綜合上述結果可推知 SCA8 的表現會降低共轉的 TBP RNA 或 36Q RNA 表現，且是經由含 CTG 重複區域產生似反義 RNA 效應所致。

肆、討論

一、建立台灣不同族群 SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫

在建立台灣族群 CTG 重複的遺傳資料庫實驗中，針對正常人、阿茲海默氏症患者、帕金森氏症患者、精神疾病患者以及其他類型之 SCA 患者等五個族群進行 SCA8 之基因型分析，結果顯示這些族群中 CTG 重複數目多分布在 18 ~ 33 個之間(97%以上)，為正常非致病範圍(表四、圖十)；其中不論族群差異，皆以 18 個 CTG 重複所佔比例最高；並發現有 CTG 擴增情形，包括 1 個 AD 患者(63 個重複)、3 個 PD 患者(84, 88, 92 個重複)及 1 個 SCA3 患者(65 個重複)，而在正常人與精神疾病患者族群中並無檢測到 CTG 擴增現象。由於所檢測到 CTG 有擴增現象的比例仍占少數，在統計上 CTG 擴增和各疾病間並無關聯性，故未來將持續收集各族群之樣本，期望以較多數據來建立國人 SCA8 基因中 CTG 重複之遺傳資料庫後，再研究 CTG 擴增與各上述疾病間之關聯性。

二、研究 SCA8 基因 CTG 擴增所造成的可能效應

(一) CTG 重複擴增對 SCA8 表現之影響

在 DM1 的研究中，認為當 CTG 重複擴增時，*DMPK* RNA 由於形成雙股髮夾的複雜結構，會滯留在細胞核中，不易送至細胞質轉譯

成蛋白質，故 *DMPK* RNA 在細胞核中的比例會較正常無擴增之 *DMPK* RNA 來得高，前人相關研究也支持該論點。然而從本論文結果卻發現不論 CTG 重複有無擴增，皆對 *SCA8* RNA 在細胞核、質中分布影響不大，可能原因有三個：第一，前人多以 DM1 病人組織作研究，但本實驗是以短暫的(transient)質體轉移來模擬 *SCA8* 在細胞中表現情形；由於質體用脂質試劑的轉移效率並不高，平均只有 10% ~ 15%，因此即使有些許差異也會被忽略。第二，由於 DM1 中 CTG 擴增數目大都超過數百個甚至為數千個，因此所形成的 RNA 髮夾二級結構會較複雜，*DMPK* RNA 彼此間的交互作用也更明顯，故 RNA 較易滯留在細胞核中；相對於本實驗所採用的突變 *SCA8*，最多僅擴增至 157 個重複，可能形成的二級結構較不複雜，較不易滯留在細胞核中。第三，前人研究中也提到用 Trizol 試劑抽取細胞核內擴增滯留之 RNA 較不易(Davis et al., 1997)，可能是滯留核內的 RNA 二級結構較複雜且會和核內基質(nuclear matrix)結合，導致抽取 RNA 不易，因此 DM1 研究中皆以 CsCl 超高速梯度離心分離出細胞核、質之 RNA。

以 actinomycin D 處理細胞來比較 *SCA8* RNA 穩定度之實驗中，可知 CTG 擴增之 *SCA8* RNA 和正常的 *SCA8* RNA 其穩定度無明顯差異。這和 DM1 之研究結果相符(Davis et al., 1997)，前人證實正常與擴增的 *DMPK* RNA 半衰期約為 13 ~ 17 個小時，二者無明顯差異。

綜合上述實驗推論，CTG 擴增與否對 *SCA8* 之 RNA 表現在細胞模式中並無顯著影響，基於此點，在後續實驗的結果可免除由於 CTG 擴增導致 RNA 表現量不同的干擾。

(二) CTG 重複擴增與 *SCA8* RNA foci 形成

在 DM1 的細胞模式研究中，當 *DMPK* 之 CTG 重複 5 個或 26 個時，不會在細胞核中形成 foci；當擴增至 57 個時，就可在細胞核中染到 RNA foci (Amack et al., 1999)，本論文結果也證實當 *SCA8* 之 CTG 重複擴增至 88 個或是 157 個時，在細胞核中也可染到 RNA foci 形成，且擴增數目愈多，可染到之 RNA foci 也愈多，可能之原因有二種：第一，是因為形成較長的(CUG)_n 的 *SCA8* RNA，所以和 Cy3-(CAG)₁₀ 探針雜合之位置也增多之緣故；第二，擴增數目愈多，含(CUG)_n 的 *SCA8* RNA 可能形成較複雜之結構，更不易送至細胞質中，故堆積在細胞核內之比例也增高，染到的 RNA foci 也較多。此外，由於質體轉移效率平均約 10% ~ 15%，而染到 RNA foci 的細胞比例卻不到 5%，可能是 *SCA8* 表現時間不夠長，形成 foci 之細胞數目太少或是 CTG 擴增數目不夠多所致；在 DM1 研究中也證實即使 *DMPK* 之 CTG 擴增至 150 個重複，染到 RNA foci 之細胞比例也只有 15%(Davis et al., 1997)，因此想提高染到 RNA foci 之細胞比例，除了

改善轉移效率外，也可將 *SCA8* 表現時間從二天延長至三天，或轉移大於 157 個 CTG 重複之重組質體。將來可進一步篩選出穩定表現 *SCA8* (野生型和擴增突變)之細胞株，提高 *SCA8* 在細胞中表現的比例，重複該實驗來量化在不同 CTG 擴增個數時，細胞產生 RNA foci 的比例或是每個細胞核中平均的 foci 數目，來探討 CTG 擴增對 foci 形成的影響。此外，在 DM1 研究中普遍觀察到 RNA foci 均形成於細胞核中，和本實驗結果相符；唯有一篇文章提到在細胞模式中 RNA foci 可在細胞核與質中形成(Amack and Mahadevan, 2001)。

(三) CTG 重複擴增對(CAG)_n RNA 之反義效應

在 DM1 的致病機轉研究中，前人提出當 CTG 擴增時，*DMPK* 基因會轉錄出含有 CUG 擴增的 mRNA，可能和細胞中帶有(CAG)_n 的 mRNA，例如轉錄因子 TBP 和 TFIID 等，因互補而產生似反義 RNA 現象(Sasagawa et al., 1999)，干擾其轉譯進行而間接影響其他基因的轉錄。然而此論點卻缺乏後續實驗結果證實。因此本論文另一研究重心放在 *SCA8* RNA 對含(CAG)_n RNA 的作用，由於人類 *TBP* 基因是廣泛表現且有重要功能之因子，故先探討 *SCA8* RNA 對 *TBP* RNA 之影響。先設計實驗證實 *SCA8* RNA 其 CUG 重複區域對含 TBP/(CAG)₃₆ RNA 表現有抑制作用，且擴增數目愈多或 *SCA8* 質體共轉之比例佔

愈高時，這種 antisense 作用也愈明顯(表七、圖十六)。爲了避免 TBP RNA 本身過量表現造成之干擾，故設計只含(CAG)₃₆ 重組質體(即 36Q)，使得 TBP 失去功能，可單獨討論 SCA8 RNA 對 36Q RNA 之影響。由結果可知，當 SCA8 RNA 含有 23 個 CUG 重複時，就會降低 TBP RNA 或 36Q RNA 的表現，且和 RNA 的 CUG 重複數目有關聯，重複數目愈多對其 RNA 降低程度也愈明顯。

(四) SCA8 完整的 ORF3 可增強對(CAG)_n RNA 反義效應

SCA8 基因轉錄出的 RNA 雖然有截接及 3' polyA 尾的結構，但因缺少顯著的 ORF，故推測沒有蛋白質產物。但經由軟體分析可推測 SCA8 上含有 3 個不顯著的 ORF，其中 ORF3 包括 CTG 重複區域。在另一實驗研究中，SCA8 上有類似 IRES (internal ribosomal entry site) 的活性(由博士班研究生蕭欣杰完成)，故 ORF3 有潛能轉譯出帶有 poly-leucine 的蛋白質(由 CUG 密碼子控制合成)，對細胞造成的毒害可能大於 poly-Q 蛋白質(Dorsman et al., 2002)。爲排除可能的 poly-leucine 蛋白質的影響，構築一缺失轉譯起始密碼的 SCA8 ORF3/CTG_{88/157} 之重組質體來作共轉移實驗，以探討(CUG)_n 本身對含 (CAG)_n RNA 的影響，是否直接經反義 RNA 機制。結果顯示轉移 SCA8 ORF3/CTG₈₈ 或 ORF3/CTG₁₅₇ 重組質體時皆會降低 TBP RNA 與 36Q RNA 之表現量，證明 SCA8 RNA 中含 CUG 重複區域對 TBP RNA 及

36Q RNA 的確有反義 RNA 效應，可提供未來研究 SCA8 致病機轉之方向。值得注意的是，當轉入 SCA8/(CTG)₈₈ 或 ORF3/CTG₈₈ 時對 TBP RNA 或 36Q RNA 造成的影響也有明顯差異，可發現轉入 SCA8/CTG₈₈ 對 TBP RNA 或 36Q RNA 的表現有更明顯的抑制作用，因此推測 SCA8 在 CTG 重複區域之前端序列，例如和 *KLHL1* 重疊之區域表現時對細胞有一定程度的影響；或是當 SCA8 有完整之 ORF3 及起始密碼 ATG，有潛能轉譯出 poly-leucine 蛋白質，對細胞造成毒害，進而使綠螢光蛋白表現量下降。

三、未來研究方向

(一)改善重組質體轉移細胞之效率

由於利用脂質試劑轉移 SCA8 質體之效率平均只有 10% ~ 15%，即使對細胞有些微影響也會因比例太少而被忽略，因此提高重組質體之轉移效率有助於觀察 SCA8 表現對細胞造成的影響。可從三方面達到此目的：第一是藉由病毒轉染細胞的方式來表現重組質體，可提高轉移效率；第二是可利用脂質試劑轉移會表現綠螢光蛋白之質體後，再經 FACS 偵測出表現綠螢光蛋白之細胞並加以分離，收集後之細胞表示有表現我們要的特定 cDNA；第三則是篩選出穩定表現 SCA8 之細胞株後，再作後續研究。

(二) *SCA8* RNA 對 TBP RNA 或 36Q RNA 之影響

雖然本實驗藉由偵測綠螢光蛋白質之表現來證明含 CUG 重複之 *SCA8* RNA 對 TBP RNA 或 36Q RNA 皆有類似反義 RNA 機制；然而此方法較間接，還需後續實驗證實二者間關係。例如共轉後用 RT-PCR 直接檢測 TBP RNA 或 36Q RNA 之表現量，觀察其 RNA 表現是否隨 *SCA8* CTG 重複擴增而降低，相對也可偵測 *SCA8* 本身 RNA 表現是否也受到影響。若證實有類似反義 RNA 效應，進一步也可偵測共轉後，細胞核內 *SCA8* RNA foci 和 TBP RNA 或 36Q RNA 表現位置是否重合，除了直接證實二者 RNA 間有交互作用，也可驗證這種反義 RNA 效應主要發生在細胞核或細胞質中。

(三) *SCA8* 表現與細胞凋亡之關聯

本實驗中當細胞短暫、大量表現 *SCA8* 時，細胞的形態會變圓，不久即懸浮死亡，且在前人研究中證實雙股 RNA 的次級結構會活化 PKR 蛋白質，並參與細胞凋亡過程(Tian et al., 2000; McLeod et al., 2005)，因此推測 *SCA8* 表現可能和細胞凋亡有關，若可藉相關實驗證明細胞有凋亡情形出現，也能提供 *SCA8* 致病機轉另一研究方向。設計實驗在細胞中轉入不同 CTG 重複之 *SCA8* 重組質體，包括正常與擴增範圍，再以一系列實驗檢測細胞凋亡情形，如 DNA ladder 產生、

TUNEL 分析、對氧化壓力之耐受程度是否改變等。

(四) SCA8 治療層面之細胞模式研究

DM1 在細胞模式中，前人研究提出二個治療方向：第一是在細胞中送入 *DMPK* 之反義 RNA 或是 hammerhead ribozyme 來干擾擴增之 *DMPK* RNA 作用，以降低細胞病徵(Furling et al., 2003; Langlois et al., 2003)。第二則是以化學藥物處理病人的白血球細胞，如 mitomycin D、mitoxantrone、 ethylmethanesulfonate (EMS)或 doxorubicin 等治癌物，發現處理後 *DMPK* CTG 重複數目會隨著代數而減少，達到治療效果(Hashem et al., 2004)。因此未來研究可著重在 SCA8 之治療層面，參考 DM1 研究可利用反義 RNA、hammerhead ribozyme 或是 RNA 干擾作用(RNA interference ; RNAi)來降低突變 SCA8 RNA 的影響；然而以化學藥物處理的方式並不適用於 SCA8 上，因為 SCA8 主要表現及影響區域多在神經系統，神經元本身就不易再分裂，因此用藥物處理後，無法像 DM1 一樣達到明顯治療效果。

伍、參考文獻

Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., and Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.

Amack, J. D., Paguio, A. P., and Mahadevan, M. S. (1999). Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum Mol Genet* 8, 1975-1984.

Amack, J. D., and Mahadevan, M. S. (2001). The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 10, 1879-1887.

Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., and et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.

Boucher, C. A., King, S. K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C. L., Rahman, S., Creavin, T., Meghji, P., Bailey, M. E., Chartier, F. L., and et al. (1995). A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)_n

repeat. *Hum Mol Genet* 4, 1919-1925.

Benzow, K. A., and Koob, M. D. (2002). The KLHL1-antisense transcript (KLHL1AS) is evolutionarily conserved. *Mamm Genome* 13, 134-141.

Bryer, A., Krause, A., Bill, P., Davids, V., Bryant, D., Butler, J., Heckmann, J., Ramesar, R., and Greenberg, J. (2003). The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci* 216, 47-54.

Brusco, A., Gellera, C., Cagnoli, C., Saluto, A., Castucci, A., Michielotto, C., Fetoni, V., Mariotti, C., Migone, N., Di Donato, S., and Taroni, F. (2004). Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol* 61, 727-733.

Bowman, A. B., Yoo, S. Y., Dantuma, N. P., and Zoghbi, H. Y. (2005). Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet* 14, 679-691.

Cellini, E., Nacmias, B., Forleo, P., Piacentini, S., Guarnieri, B. M., Serio, A., Calabro, A., Renzi, D., and Sorbi, S. (2001). Genetic and clinical analysis of spinocerebellar ataxia type 8 repeat expansion in Italy. *Arch Neurol* 58, 1856-1859.

Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., and Housman, D. E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7388-7393.

Day, J. W., Schut, L. J., Moseley, M. L., Durand, A. C., and Ranum, L. P. (2000). Spinocerebellar ataxia type 8: clinical features in a large family. *Neurology* *55*, 649-657.

Dorsman, J. C., Pepers, B., Langenberg, D., Kerkdijk, H., Ijszenga, M., den Dunnen, J. T., Roos, R. A., and van Ommen, G. J. (2002). Strong aggregation and increased toxicity of polyleucine over polyglutamine stretches in mammalian cells. *Hum Mol Genet* *11*, 1487-1496.

Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., and et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* *255*, 1256-1258.

Furling, D., Doucet, G., Langlois, M. A., Timchenko, L., Belanger, E., Cossette, L., and Puymirat, J. (2003). Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* *10*, 795-802.

Harris, S., Moncrieff, C., and Johnson, K. (1996). Myotonic dystrophy:

will the real gene please step forward! *Hum Mol Genet* 5 *Spec No*, 1417-1423.

Hashem, V. I., Pytlos, M. J., Klysik, E. A., Tsuji, K., Khajavi, M., Ashizawa, T., and Sinden, R. R. (2004). Chemotherapeutic deletion of CTG repeats in lymphoblast cells from DM1 patients. *Nucleic Acids Res* 32, 6334-6346.

Ikeda, Y., Shizuka-Ikeda, M., Watanabe, M., Schmitt, M., Okamoto, K., and Shoji, M. (2000a). Asymptomatic CTG expansion at the SCA8 locus is associated with cerebellar atrophy on MRI. *J Neurol Sci* 182, 76-79.

Ikeda, Y., Shizuka, M., Watanabe, M., Okamoto, K., and Shoji, M. (2000b). Molecular and clinical analyses of spinocerebellar ataxia type 8 in Japan. *Neurology* 54, 950-955.

Izumi, Y., Maruyama, H., Oda, M., Morino, H., Okada, T., Ito, H., Sasaki, I., Tanaka, H., Komure, O., Udaka, F., *et al.* (2003). SCA8 repeat expansion: large CTA/CTG repeat alleles are more common in ataxic patients, including those with SCA6. *Am J Hum Genet* 72, 704-709.

Jansen, G., Mahadevan, M., Amemiya, C., Wormskamp, N., Segers, B., Hendriks, W., O'Hoy, K., Baird, S., Sabourin, L., Lennon, G., and *et al.* (1992). Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat Genet* 1, 261-266.

Jansen, G., Bachner, D., Coerwinkel, M., Wormskamp, N., Hameister, H., and Wieringa, B. (1995). Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus. *Hum Mol Genet* 4, 843-852.

Juvonen, V., Hietala, M., Paivarinta, M., Rantamaki, M., Hakamies, L., Kaakkola, S., Vierimaa, O., Penttinen, M., and Savontaus, M. L. (2000). Clinical and genetic findings in Finnish ataxia patients with the spinocerebellar ataxia 8 repeat expansion. *Ann Neurol* 48, 354-361.

Juvonen, V., Kairisto, V., Hietala, M., and Savontaus, M. L. (2002). Calculating predictive values for the large repeat alleles at the SCA8 locus in patients with ataxia. *J Med Genet* 39, 935-936.

Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., and Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406.

Koch, K. S., and Leffert, H. L. (1998). Giant hairpins formed by CUG repeats in myotonic dystrophy messenger RNAs might sterically block RNA export through nuclear pores. *J Theor Biol* 192, 505-514.

Koob, M. D., Moseley, M. L., Schut, L. J., Benzow, K. A., Bird, T. D., Day, J. W., and Ranum, L. P. (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21, 379-384.

Korade-Mirnic, Z., Tarleton, J., Servidei, S., Casey, R. R., Gennarelli, M., Pegoraro, E., Angelini, C., and Hoffman, E. P. (1999). Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression. *Hum Mol Genet* 8, 1017-1023.

Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109.

Langlois, M. A., Lee, N. S., Rossi, J. J., and Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 7, 670-680.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.

Moseley, M. L., Benzow, K. A., Schut, L. J., Bird, T. D., Gomez, C. M., Barkhaus, P. E., Blindauer, K. A., Labuda, M., Pandolfo, M., Koob, M. D., and Ranum, L. P. (1998). Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* 51, 1666-1671.

Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson,

M. S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* 27, 3534-3542.

Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19, 4439-4448.

McCampbell, A., Taylor, J. P., Taye, A. A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., and Fischbeck, K. H. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9, 2197-2202.

Moseley, M. L., Schut, L. J., Bird, T. D., Koob, M. D., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2000). SCA8 CTG repeat: en masse contractions in sperm and intergenerational sequence changes may play a role in reduced penetrance. *Hum Mol Genet* 9, 2125-2130.

Maruyama, H., Izumi, Y., Morino, H., Oda, M., Toji, H., Nakamura, S., and Kawakami, H. (2002). Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet* 114, 578-583.

Michalik, A., and Van Broeckhoven, C. (2003). Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet* 12 *Spec*

No 2, R173-186.

McLeod, C. J., O'Keefe, L. V., and Richards, R. I. (2005). The pathogenic agent in *Drosophila* models of 'polyglutamine' diseases. *Hum Mol Genet* 14, 1041-1048.

Nemes, J. P., Benzow, K. A., Moseley, M. L., Ranum, L. P., and Koob, M. D. (2000). The SCA8 transcript is an antisense RNA to a brain-specific transcript encoding a novel actin-binding protein (KLHL1). *Hum Mol Genet* 9, 1543-1551.

Otten, A. D., and Tapscott, S. J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5465-5469.

Perez, M. K., Paulson, H. L., Pendse, S. J., Saionz, S. J., Bonini, N. M., and Pittman, R. N. (1998). Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143, 1457-1470.

Pato, C. N., Macedo, A., Ambrosio, A., Vincent, J. B., Bauer, A., Schindler, K., Xu, J., Coelho, I., Dourado, A., Valente, J., *et al.* (2000). Detection of expansion regions in Portuguese bipolar families. *Am J Med Genet* 96, 854-857.

Robinson, D. N., and Cooley, L. (1997). *Drosophila kelch* is an

oligomeric ring canal actin organizer. *J Cell Biol* 138, 799-810.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., and Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595.

Shaw, D. J., McCurrach, M., Rundle, S. A., Harley, H. G., Crow, S. R., Sohn, R., Thirion, J. P., Hamshere, M. G., Buckler, A. J., Harper, P. S., and et al. (1993). Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* 18, 673-679.

Schols, L., Amoiridis, G., Buttner, T., Przuntek, H., Epplen, J. T., and Riess, O. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 42, 924-932.

Strong, P. N., and Brewster, B. S. (1997). Myotonic dystrophy: molecular and cellular consequences of expanded DNA repeats are elusive. *J Inherit Metab Dis* 20, 159-170.

Sasagawa, N., Takahashi, N., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). An expanded CTG trinucleotide repeat causes trans RNA interference: a new hypothesis for the pathogenesis of myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 76-80.

Saleem, Q., Choudhry, S., Mukerji, M., Bashyam, L., Padma, M. V., Chakravarthy, A., Maheshwari, M. C., Jain, S., and Brahmachari, S. K. (2000). Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum Genet* 106, 179-187.

Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114.

Schols, L., Szymanski, S., Peters, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Hardt, C., and Riess, O. (2000). Genetic background of apparently idiopathic sporadic cerebellar ataxia. *Hum Genet* 107, 132-137.

Stevanin, G., Herman, A., Durr, A., Jodice, C., Frontali, M., Agid, Y., and Brice, A. (2000). Are (CTG)_n expansions at the SCA8 locus rare polymorphisms? *Nat Genet* 24, 213; author reply 215.

Silveira, I., Alonso, I., Guimaraes, L., Mendonca, P., Santos, C., Maciel, P., Fidalgo De Matos, J. M., Costa, M., Barbot, C., Tuna, A., *et al.* (2000). High germinal instability of the (CTG)_n at the SCA8 locus of both expanded and normal alleles. *Am J Hum Genet* 66, 830-840.

Sobrido, M. J., Cholfin, J. A., Perlman, S., Pulst, S. M., and Geschwind, D. H. (2001). SCA8 repeat expansions in ataxia: a controversial association. *Neurology* 57, 1310-1312.

Soong, B. W., Lu, Y. C., Choo, K. B., and Lee, H. Y. (2001). Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Taiwanese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Arch Neurol* 58, 1105-1109.

Silveira, I., Miranda, C., Guimaraes, L., Moreira, M. C., Alonso, I., Mendonca, P., Ferro, A., Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreirinha, F., *et al.* (2002). Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)_n allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol* 59, 623-629.

Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., and Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3, 291-304.

Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R. T., 3rd (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409.

Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., and Thornton, C. A. (2000). Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Rna* 6, 79-87.

Tang, B., Liu, C., Shen, L., Dai, H., Pan, Q., Jing, L., Ouyang, S., and Xia, J. (2000). Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary

spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol* 57, 540-544.

Takahashi, N., Sasagawa, N., Usuki, F., Kino, Y., Kawahara, H., Sorimachi, H., Maeda, T., Suzuki, K., and Ishiura, S. (2001). Coexpression of the CUG-binding protein reduces DM protein kinase expression in COS cells. *J Biochem (Tokyo)* 130, 581-587.

Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.

Topisirovic, I., Dragasevic, N., Savic, D., Ristic, A., Keckarevic, M., Keckarevic, D., Culjkovic, B., Petrovic, I., Romac, S., and Kostic, V. S. (2002). Genetic and clinical analysis of spinocerebellar ataxia type 8 repeat expansion in Yugoslavia. *Clin Genet* 62, 321-324.

Tazon, B., Badenas, C., Jimenez, L., Munoz, E., and Mila, M. (2002). SCA8 in the Spanish population including one homozygous patient. *Clin Genet* 62, 404-409.

Vincent, J. B., Neves-Pereira, M. L., Paterson, A. D., Yamamoto, E., Parikh, S. V., Macciardi, F., Gurling, H. M., Potkin, S. G., Pato, C. N., Macedo, A., *et al.* (2000a). An unstable trinucleotide-repeat region on chromosome 13 implicated in spinocerebellar ataxia: a common expansion locus. *Am J Hum Genet* 66, 819-829.

Vincent, J. B., Yuan, Q. P., Schalling, M., Adolfsson, R., Azevedo, M. H., Macedo, A., Bauer, A., DallaTorre, C., Medeiros, H. M., Pato, M. T., *et al.* (2000b). Long repeat tracts at SCA8 in major psychosis. *Am J Med Genet* 96, 873-876.

Wang, Y. H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D., and Griffith, J. D. (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265, 669-671.

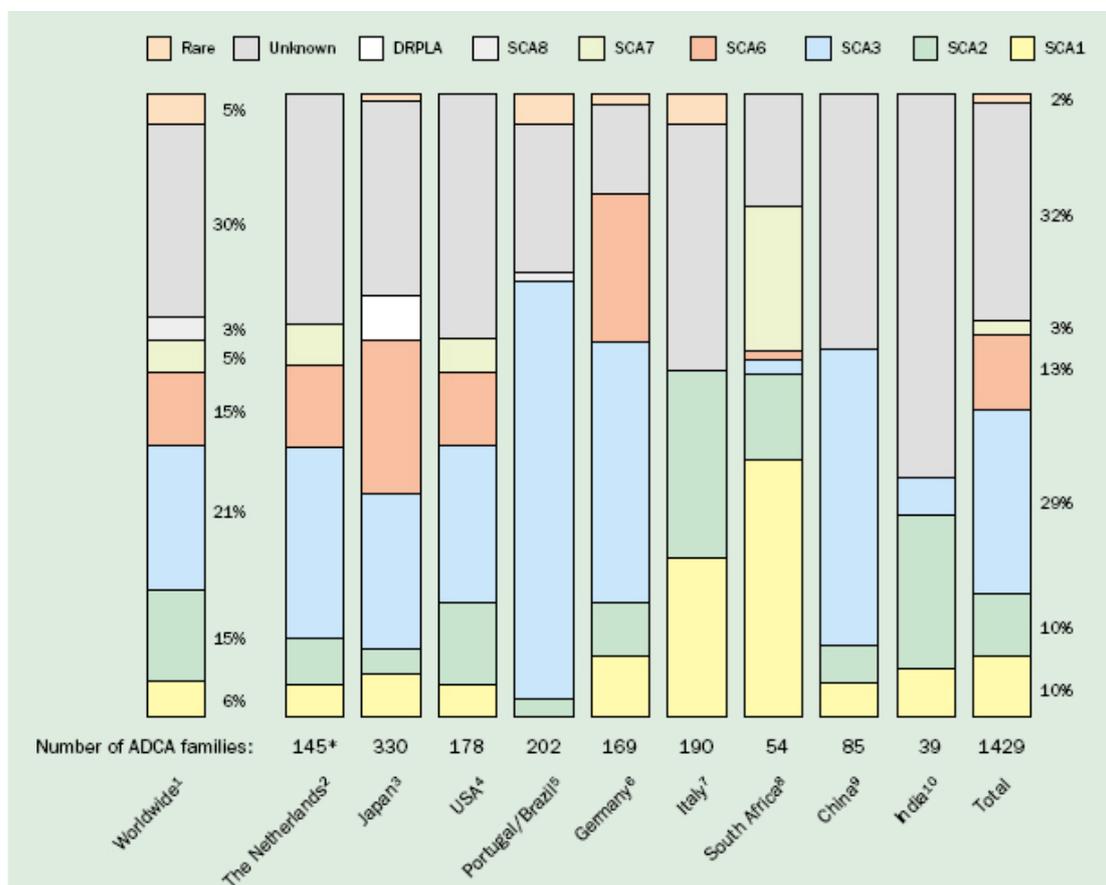
Wieringa, B. (1994). Myotonic dystrophy reviewed: back to the future? *Hum Mol Genet* 3, 1-7.

Wang, Y. H., and Griffith, J. (1995). Expanded CTG triplet blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements. *Genomics* 25, 570-573.

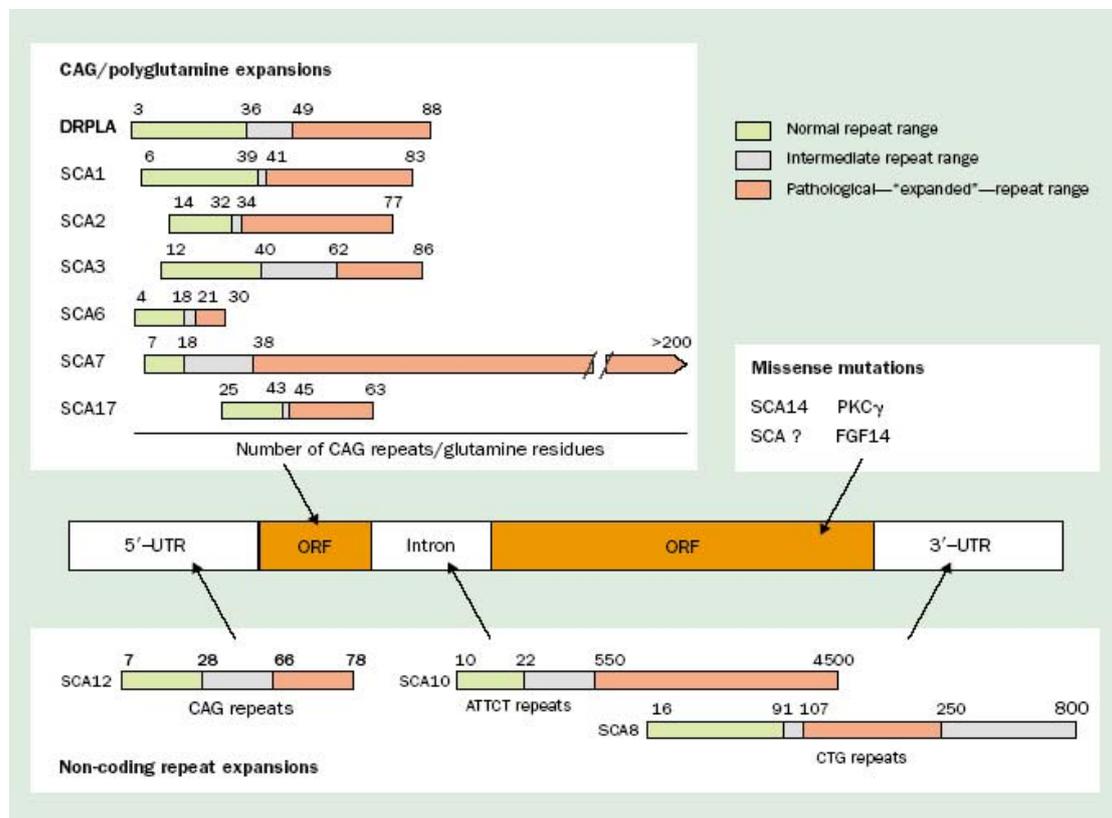
Worth, P. F., Houlden, H., Giunti, P., Davis, M. B., and Wood, N. W. (2000). Large, expanded repeats in SCA8 are not confined to patients with cerebellar ataxia. *Nat Genet* 24, 214-215.

Yamada, M., Sato, T., Shimohata, T., Hayashi, S., Igarashi, S., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2001). Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *Am J Pathol* 159, 1785-1795.

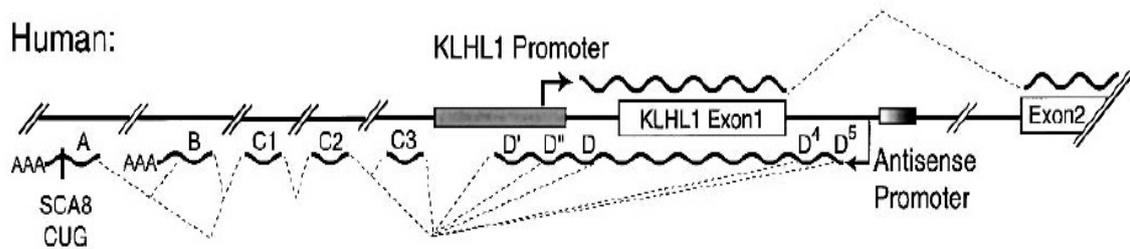
陸、附錄圖表



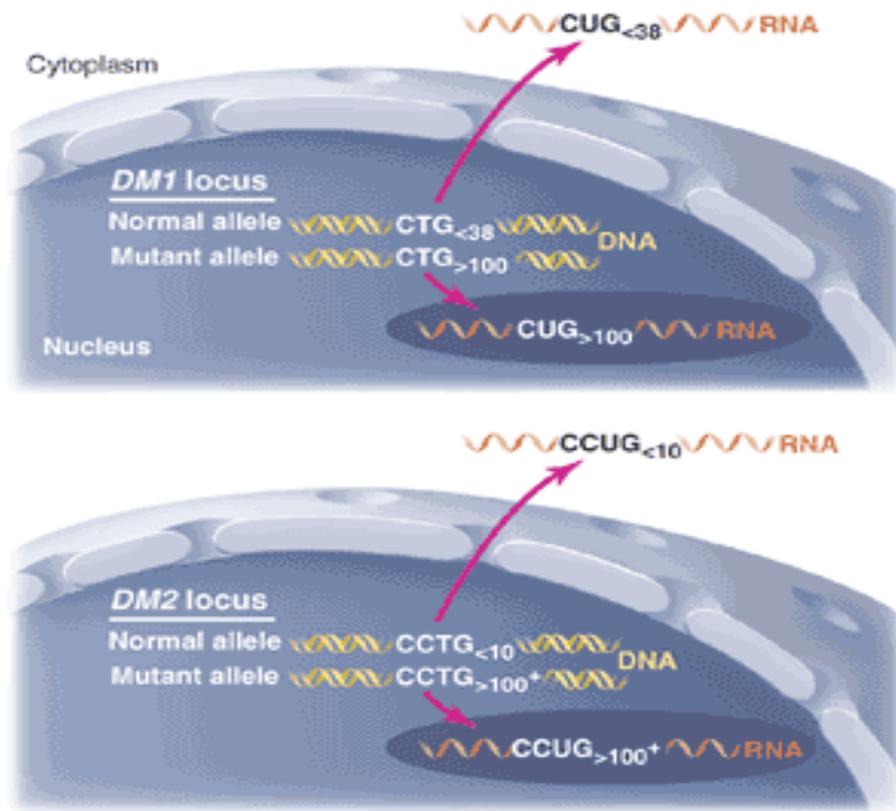
圖一、各型 SCA 在世界上之盛行率(Schols et al., 2004)。研究顯示 SCA3 是全世界最普遍之 SCA 類型，未判定之 SCA 也佔多數。其中 rare SCA 包括 SCA10、SCA12、SCA14 和 SCA17 等類型；ADCA 表示 autosomal dominant cerebellar ataxia。



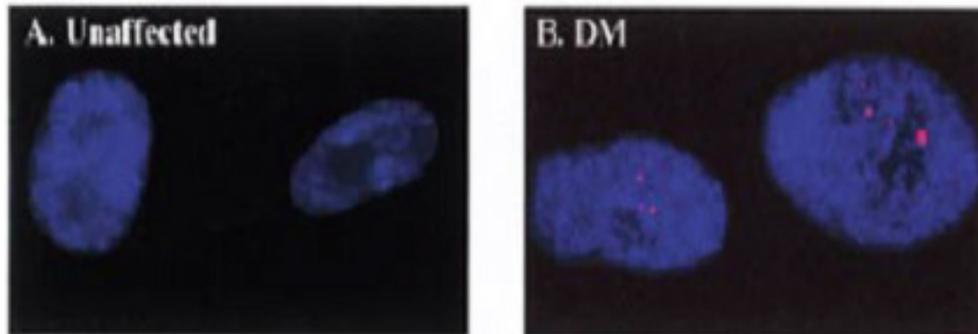
圖二、各型 SCA 其致病基因在分子層次上之分類(Schols et al., 2004)。其中 DRPLA (dentatorubro-pallidoluysian atrophy)、SCA1-3、SCA6、SCA7 和 SCA17 等型在 ORF 中有 CAG 重複擴增；SCA8 在 3' UTR 有 CTG 重複擴增；SCA10 在 intron 中有 ATTCT 重複擴增；而 SCA12 則在 5' UTR 有 CAG 重複擴增情形。



圖三、*SCA8* 與 *KLHL1* 基因輿圖(Nemes et al., 2000)。 *SCA8* 基因的啓動子位於 *KLHL1* 基因的 intron 1 中，而且 *SCA8* 與 *KLHL1* 基因轉錄方向相反，故在 *SCA8* 與 *KLHL1* mRNA 的 5'端部份序列有互補現象，此外 *SCA8* mRNA 有 alternative splicing 且在 3'尾端接上 polyA。

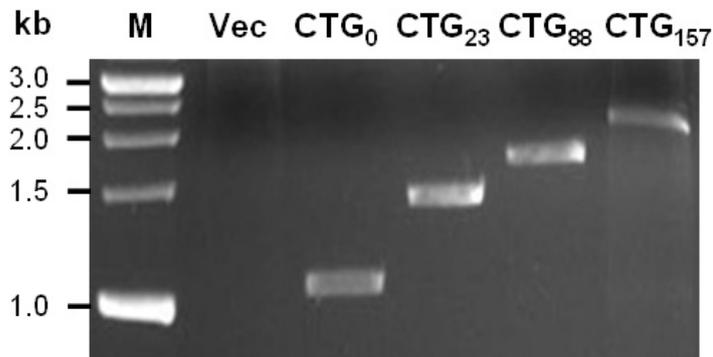
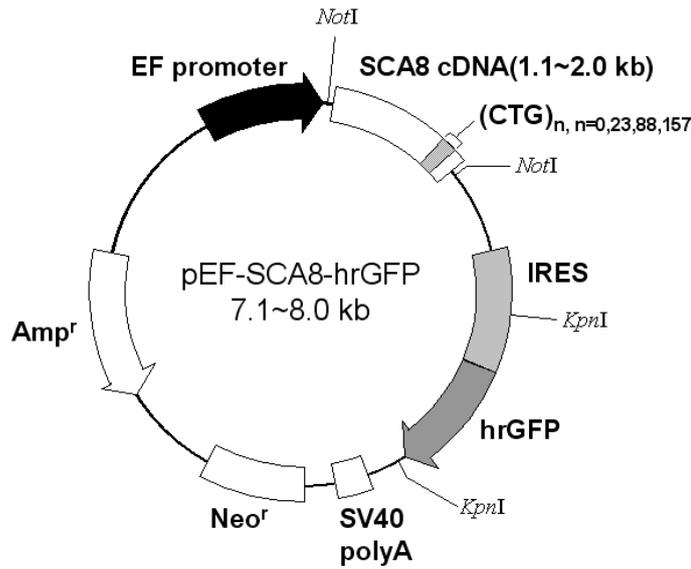


圖四、DM1 與 DM2 之致病基因([Http://www.neurocast.com/site/content/sessions_05_2002.asp](http://www.neurocast.com/site/content/sessions_05_2002.asp))。DM1 中正常之對偶基因(allele) CTG 重複數目小於 38 個，而突變之對偶基因可擴增至 100 個以上；DM2 中正常之對偶基因 CCTG 重複數目多小於 10 個，而突變之對偶基因可擴增至 100 個以上。在 DM1 或 DM2 中其突變 RNA 皆會滯留在細胞核中。

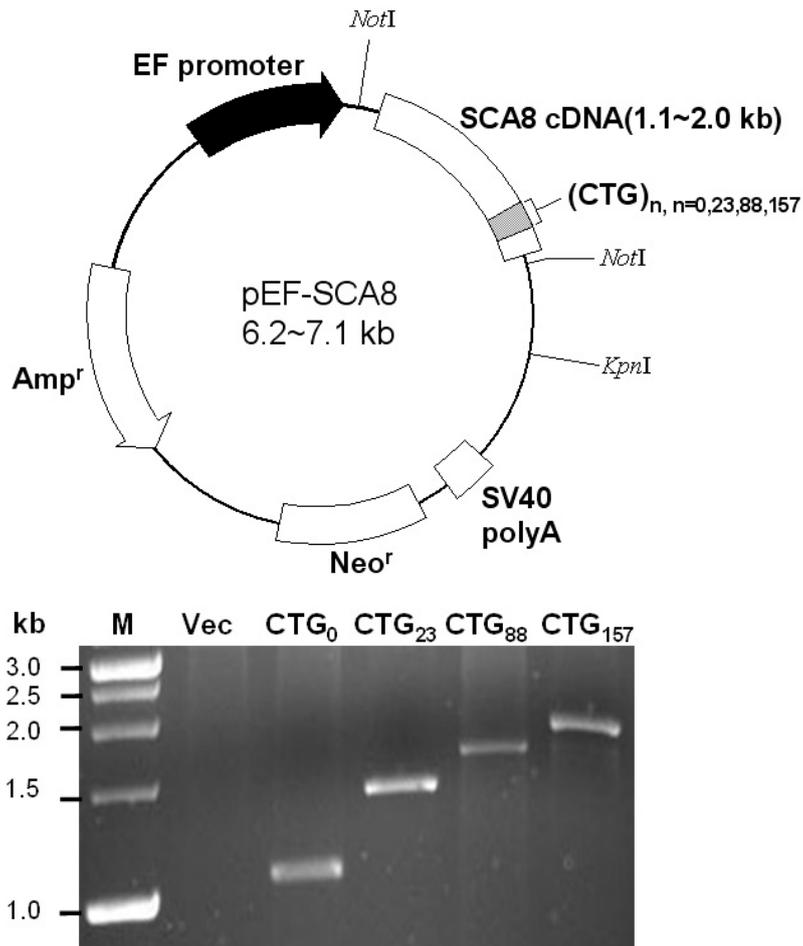


圖五、DM1 病人肌肉細胞核之 *DMPK* RNA foci (Amack et al., 1999)。

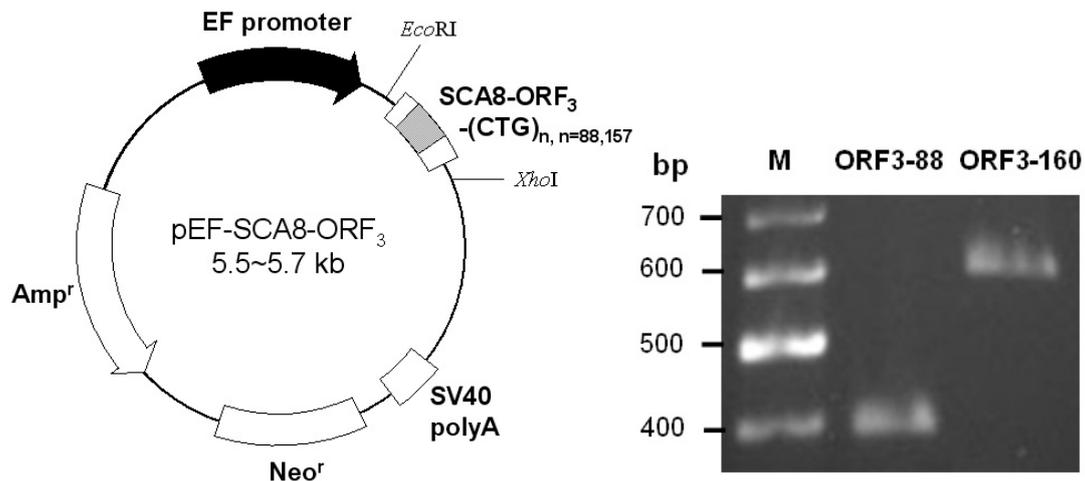
圖 A 表示正常人的肌肉細胞之細胞核，圖 B 表示 DM1 病人之肌肉細胞的核中有 *DMPK* 之 RNA foci 形成，可設計 Cy3-(CAG)₁₀ 探針以 RNA-FISH 技術觀察。圖中藍色表示以 DAPI 染劑染細胞核，圖 B 中的紅點表示 RNA foci 之位置。



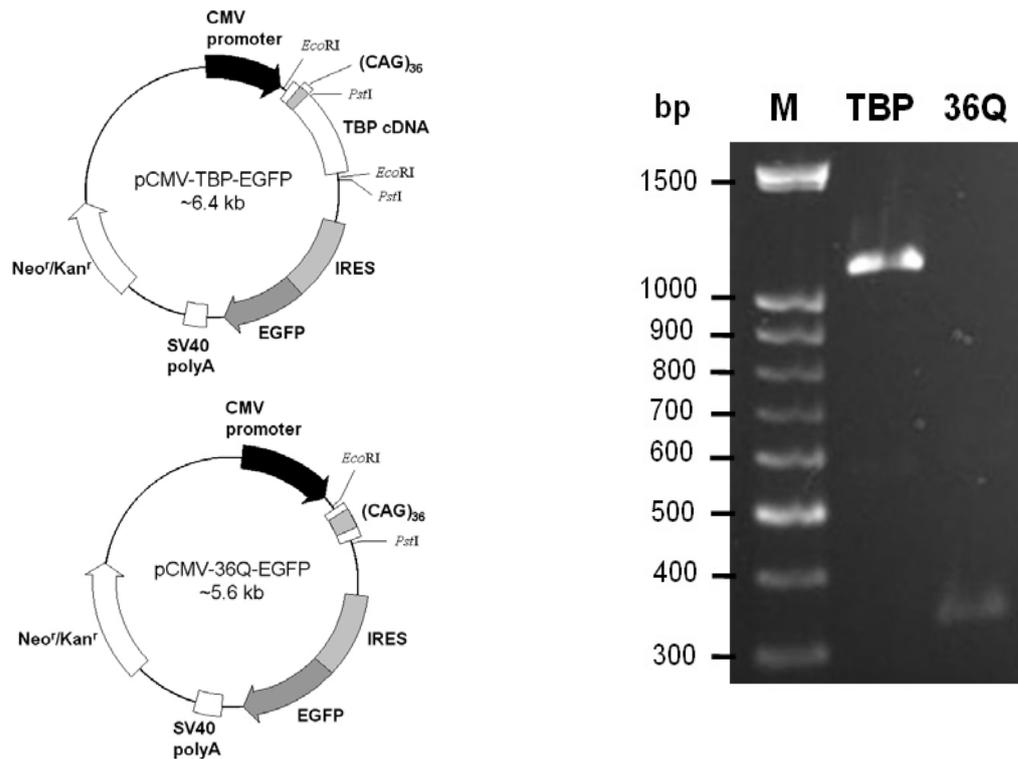
圖六、pEF-SCA8/(CTG)_n-hrGFP 重組質體(上)與限制酶確認分析(下)。
 由 EF 啟動子啟動下游基因之表現，在 MCS (multiple cloning site)中以
NotI 切位引入不同 CTG 重複數目之 SCA8 cDNA，包括 0, 23, 88, 157
 個重複，其中 23 個 CTG 重複表示正常人的範圍，88 和 157 個表示
 CTG 擴增。並以 *NotI* 限制酶切割作確認分析，可切出 SCA8 cDNA 之
 片段。圖中 M 表示 marker，Vec 表示未引入 SCA8 cDNA 之質體；而
 不同質體中所切下的 SCA8 cDNA 片段，由大至小分別約為 2 kb、1.7
 kb、1.5 kb 及 1.1 kb；另各重組質體皆可切下的空質體大小約為
 6.0kb(膠圖上沒有顯示)。



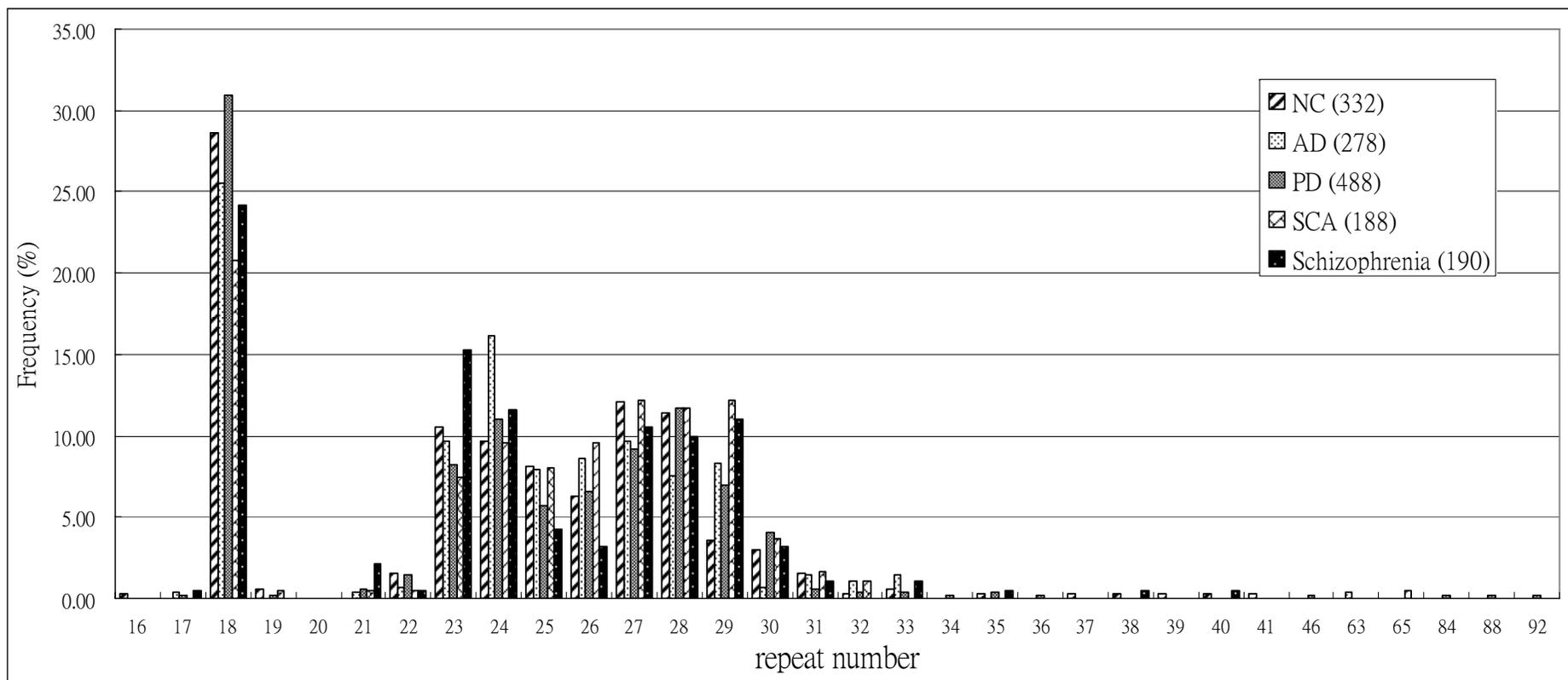
圖七、pEF-SCA8/(CTG)_n重組質體(上)與限制酶確認分析(下)。由 EF 啓動子啓動下游基因之表現，在 MCS (multiple cloning site)中以 *NotI* 切位引入不同 CTG 重複數目之 *SCA8* cDNA，包括 0, 23, 88, 157 個重複，其中 23 個 CTG 重複表示正常人的範圍，88 和 157 個表示 CTG 擴增，並以 *KpnI* 破壞 hrGFP。以 *NotI* 限制酶切割作確認分析，可切出 *SCA8* cDNA 之片段。圖中 M 表示 marker，Vec 表示未引入 *SCA8* cDNA 之質體；而不同質體中所切下的 *SCA8* cDNA 片段，由大至小分別約為 2 kb、1.7 kb、1.5 kb 及 1.1 kb；另各重組質體皆可切下的空質體大小約為 5.1kb(膠圖上沒有顯示)。



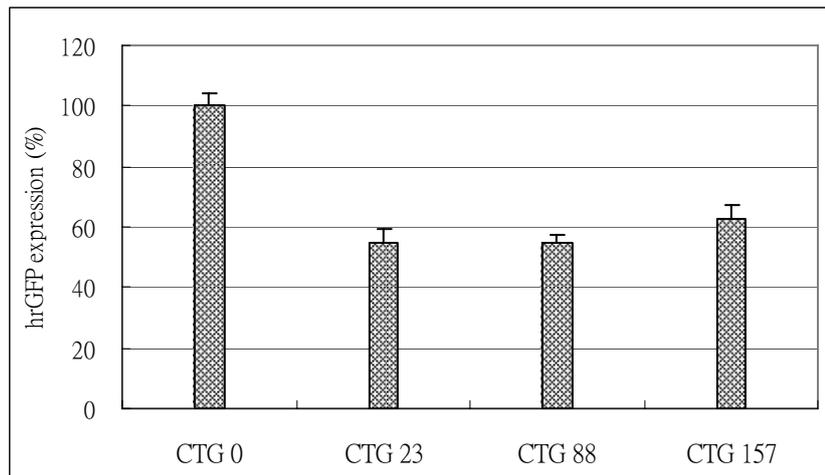
圖八、SCA8 ORF3 重組質體(左)與限制酶確認分析(右)。由 EF 啟動子啟動下游基因之表現，以 *EcoRI* 與 *XhoI* 切位引入不同 CTG 重複數目之 SCA8 ORF3 cDNA，包括 88 和 157 個重複，皆為 CTG 擴增，經定序分析後轉譯起始密碼 ATG 之 A 有缺失，故只會轉錄 RNA 但不會轉譯成蛋白質。以 *EcoRI* 與 *XhoI* 限制酶切割作確認分析，可切出 SCA8-ORF3 cDNA 之片段，大小分別約為 400 bp 和 610 bp。圖中 M 表示 marker；另各重組質體皆可切下的空質體大小約為 5.1kb(膠圖上沒有顯示)。



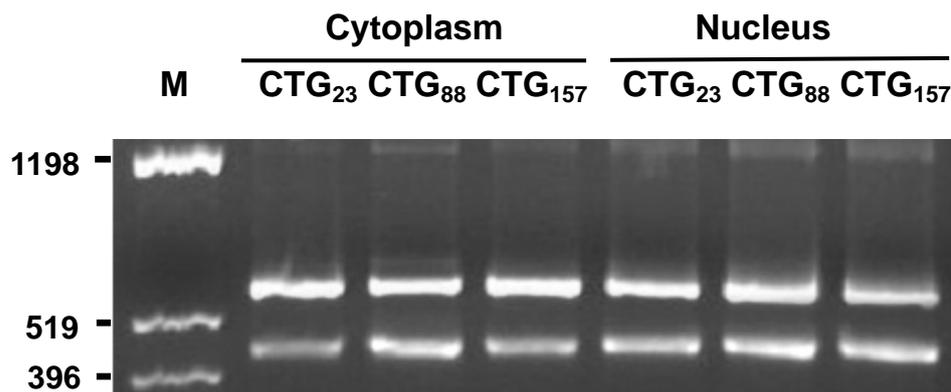
圖九、pCMV-TBP-EGFP、pCMV-36Q-EGFP 重組質體(左)與限制酶確認分析(右)。由 CMV 啟動子啟動下游基因之表現，以 *EcoRI* 切位引入 36 個 CAG 重複數目之人類正常 TBP cDNA，製備 pCMV-TBP-EGFP(左上圖)。再以 *PstI* 限制酶去除 TBP cDNA 中 CAG 重複後之大部分序列，即可完成含有 36 個 CAG 重複(可轉譯成 36 個 glutamine)之 pCMV-36Q-EGFP 重組質體(左下圖)，且無 TBP 之完整功能。pCMV-TBP-EGFP 質體以 *EcoRI* 限制酶切割作確認分析，可切出 TBP cDNA 之片段，大小約為 1070 bp；而 pCMV-36Q-EGFP 質體以 *EcoRI* 和 *PstI* 雙切即可切出 TBP N 端 cDNA 含 36 個 CAG 重複之片段，大小約為 330 bp。圖中 M 表示 marker；另各重組質體皆可切下的空質體大小約為 5.3kb(膠圖上沒有顯示)。



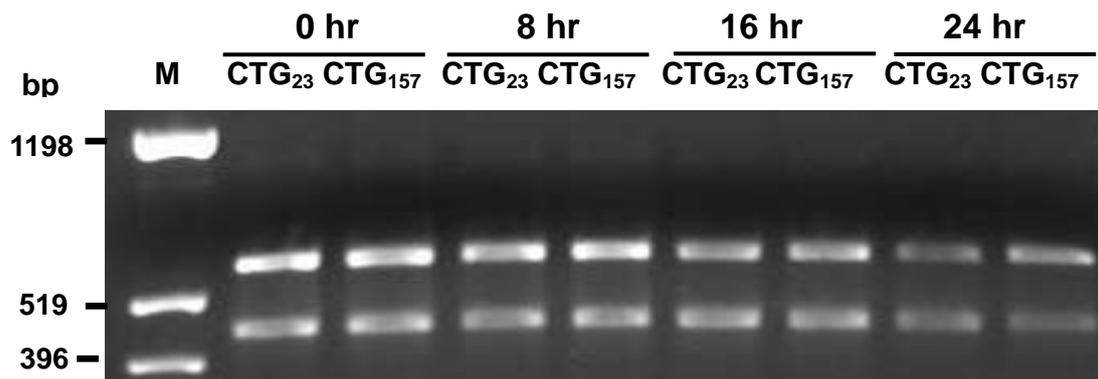
圖十、正常人(NC)及 AD、PD、SCA、Schizophrenia 患者 SCA8 (CTG)_n 對偶基因分佈。發現 5 個對偶基因有擴增，包括 1 個 AD 患者(63 個)、3 個 PD 患者(84, 88, 92 個)及 1 個 SCA3 患者(65 個)。圖中橫軸表示 CTG 重複數目，縱軸表示所佔族群的頻率(%)，各族群後數字表示所分析之對偶基因數目。



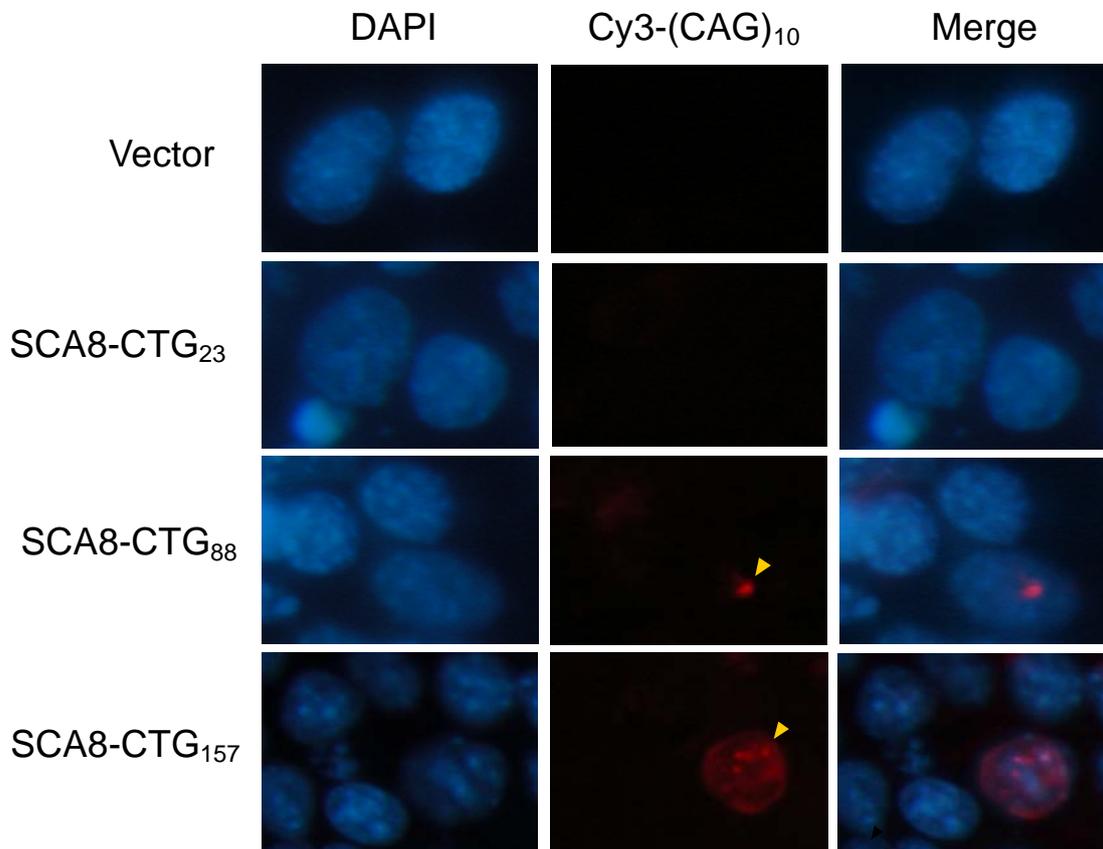
圖十一、FACS 分析 pEF-SCA8/(CTG)_n-hrGFP 表現情形。在 P19 細胞中分別轉入 SCA8-CTG_n-hrGFP (n=0, 23, 88, 157)之重組質體，2 天後以 FACS 分析 SCA8 基因表現情形。圖中以 SCA8-CTG₀-hrGFP 質體之 hrGFP 表現量作為 100%，與其餘重組質體之表現相對比較。圖中橫軸代表所轉入之重組質體，縱軸代表綠螢光表現之平均強度，各柱上之 bar 表示標準差。



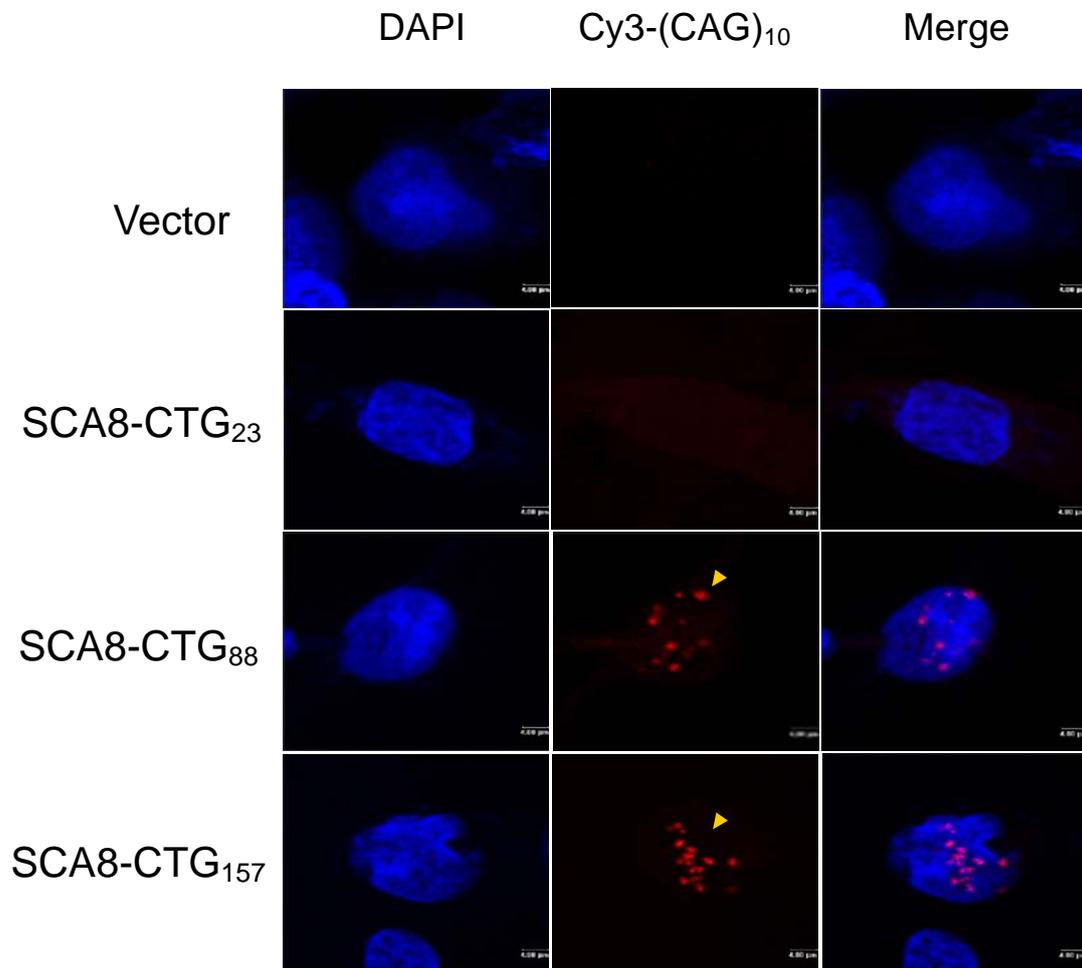
圖十二、RT-PCR 分析細胞核、細胞質中 *SCA8* RNA 之分佈情形。在 P19 細胞轉染 pEF-*SCA8*-hrGFP 後，分別抽細胞核、質 RNA 及 RT-PCR。上列片段分別表示細胞質、細胞核中不同 *SCA8*-CTG_n (n = 23, 88, 157) RNA 表現情形，大小為 594 bp；下列片段表示以 *Neomycin* RNA 作為校正，大小為 450 bp。圖中 M 為 pGEM-4 質體的限制酶 *Hinf*I 切割結果，作為片段大小標記。



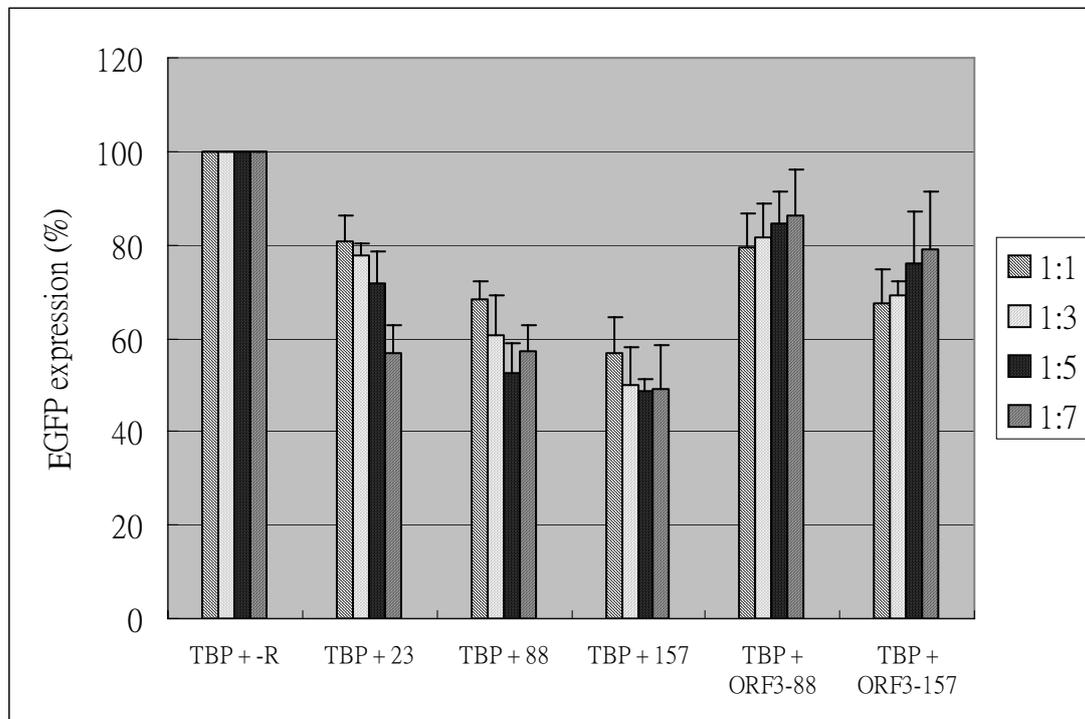
圖十三、RT-PCR 分析 *SCA8* RNA 的穩定性。加入 actinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$)後，分別經 0, 8, 16, 24 hr 後抽細胞 RNA，以 RT-PCR 檢測 RNA 表現情形。圖中較大的片段為 *SCA8* RNA 表現情形，大小為 594 bp；較小的片段為 neomycin RNA 作為校正，大小為 450 bp。圖中 M 為 pGEM-4 質體的限制酶 *HinfI* 切割結果，作為片段大小標記。



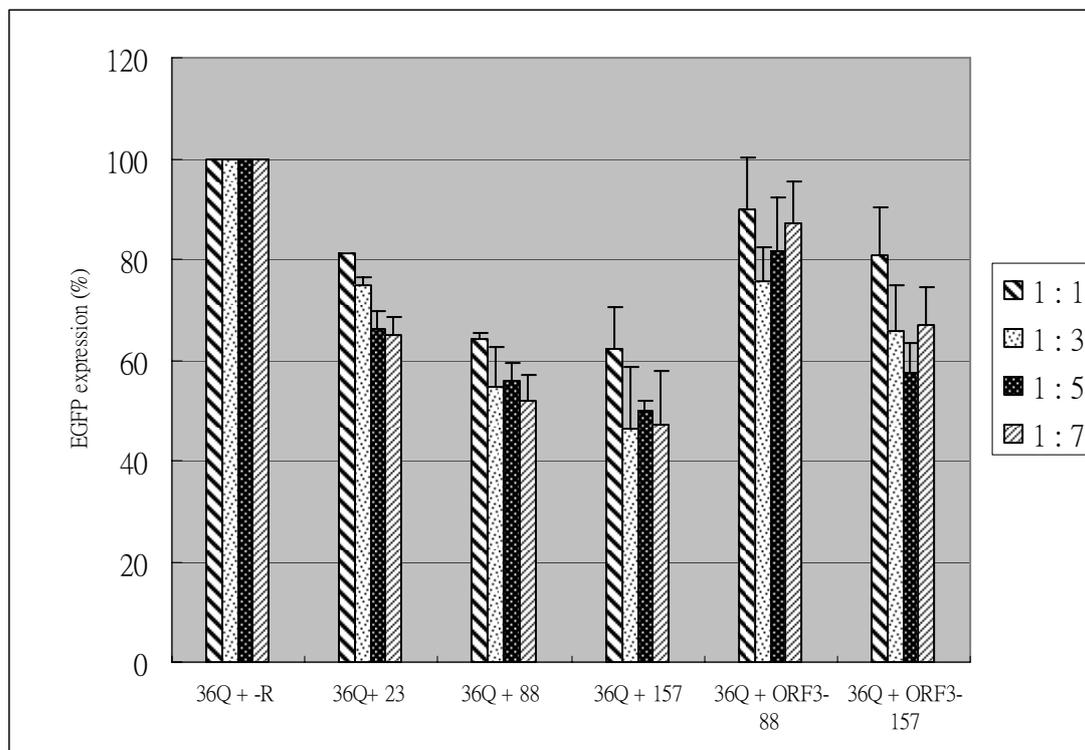
圖十四、SCA8 之 CTG 擴增時在 P19 細胞之核中形成 RNA foci。轉入 Vector、pEF-SCA8/(CTG)_n (n = 23, 88, 157)質體後，利用 RNA-FISH 將 Cy3-(CAG)₁₀ 探針作雜合。圖中左行表示用 DAPI 染細胞核之情形；中間紅點表示 SCA8 RNA foci 形成；右行 Merge 表示將細胞核與 RNA foci 二圖疊合之情形，觀察 RNA foci 之位置。Vector 表示不含 SCA8 cDNA 之質體；圖中箭頭所指表示 RNA foci 的位置。



圖十五、CTG 擴增的 *SCA8* RNA 在 HEK-293 之細胞核中形成 RNA foci。轉入 Vector、pEF-*SCA8*/(CTG)_n (n = 23, 88, 157)質體後，利用 RNA-FISH 將 Cy3-(CAG)₁₀ 探針作雜合。圖中左行表示用 DAPI 染細胞核之情形；中間紅點表示 *SCA8* RNA foci 形成；右行 Merge 表示將細胞核與 RNA foci 二圖疊合之情形，觀察 RNA foci 之位置。Vector 表示不含 *SCA8* cDNA 之質體；圖中箭頭所指表示 RNA foci 的位置。



圖十六、FACS 分析 pCMV-TBP-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形。在 HEK-293 細胞中共轉 pCMV-TBP-EGFP 與不同之 SCA8 重組質體：包括 pEF-SCA8/CTG_n (n = 0, 23, 88, 157)、pEF-SCA8/ORF3-88 與 pEF-SCA8/ORF3-157 等，且共轉質體之比例由 1:1 提高至 1:7。圖中以 pCMV-TBP-EGFP 和 pEF-SCA8/CTG₀ (即 TBP + -R) 共轉後之 EGFP 表現作為 100%，並換算出其他組相對應之比例，而各柱上之 bar 表示標準差。



圖十七、FACS 分析 pCMV-36Q-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形。在 HEK-293 細胞中共轉 pCMV-36Q-EGFP 與不同之 SCA8 重組質體：包括 pEF-SCA8/(CTG)_n (n = 0, 23, 88, 157)、pEF-ORF3/(CTG)₈₈ 與 pEF-ORF3/(CTG)₁₅₇，且共轉質體之比例由 1:1 提高至 1:7。圖中以 pCMV-36Q-EGFP 和 pEF-SCA8/(CTG)₀ (即 36Q + -R) 共轉後之 EGFP 表現作為 100%，並換算出其他組相對應之比例，而各柱上之 bar 表示標準差。

表一、各型 SCA 與其致病基因

疾病	基因	蛋白質產物	重複單位：位置	擴增範圍
SCA1	<i>SCA1</i>	ataxin 1	CAG：5' exon	40-82
SCA2	<i>SCA2</i>	ataxin 2	CAG：5' exon	34-59
SCA3	<i>SCA3</i>	ataxin 3	CAG：3' exon	55-200
SCA6	<i>CACNA1A</i>	α_{1A} -Ca ²⁺ channel	CAG：3' exon	21-33
SCA7	<i>SCA7</i>	ataxin 7	CAG：5' exon	37>300
SCA8	<i>SCA8</i>	-----	CTG：3' UTR	68-800
SCA10	<i>SCA10</i>	E46	ATTCT：intron 9	>1000
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	PPP2AB β	CAG：promoter	60-93
SCA17	<i>SCA17</i>	TBP	CAG：5' exon	43-78

註：SCA8 之前認為並無蛋白質產物。

表二、PCR 分析 SCA8 CTG 重複的引子對及條件

引子對 (5' → 3')	鍊合 溫度 (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)	長度 (bp)
F3:Fam-GCTTGTGAGGACTGAGAATG R4: CCCTGGGTCCTTCATGTTAG	60	1.5	10	~300

表三、RT-PCR 引子對及條件

引子對 (5' → 3')	鍊合 溫度 (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)	長度 (bp)
<i>SCA8-cDNA-2</i> :				
CTTTTCGCCCAGAGCCTGACATG				
<i>SCA8-cDNA-3</i> :	60	1.5	10	594
CTAACATGAAGGACCCAGGG				
<i>Neomycin-3</i> :				
CCCTGATGCTCTTCGTCCAG				
<i>Neomycin-5</i> :	55	1.5	10	450
TTGGGTGGAGAGGCTATTCG				

表四、台灣地區正常人族群(NC)及阿茲海默氏症(AD)、帕金森氏症(PD)、小腦萎縮病(SCA)、精神疾病(Schizophrenia)等族群 SCA8 基因 (CTG)_n 各對偶基因的頻率(數目)分佈

Repeat number	NC (332)	AD (278)	PD (488)	SCA (188)	Schizophrenia (190)
16	0.30	-	-	-	-
17	-	0.36	0.20	-	0.53
18	28.61	25.54	30.94	20.74	24.21
19	0.60	-	0.20	0.53	-
21	-	0.36	0.61	0.53	2.11
22	1.51	0.72	1.43	0.53	0.53
23	10.54	9.71	8.20	7.45	15.26
24	9.64	16.19	11.07	9.57	11.58
25	8.13	7.91	5.74	7.98	4.21
26	6.33	8.63	6.56	9.57	3.16
27	12.05	9.71	9.22	12.23	10.53
28	11.45	7.55	11.68	11.70	10.00
29	3.61	8.27	6.97	12.23	11.05
30	3.01	0.72	4.10	3.72	3.16
31	1.51	1.44	0.61	1.60	1.05
32	0.30	1.08	0.41	1.06	-
33	0.60	1.44	0.41	-	1.05
34	-	-	0.20	-	-
35	0.30	-	0.41	-	0.53
36	-	-	0.20	-	-
37	0.30	-	-	-	-
38	0.30	-	-	-	0.53
39	0.30	-	-	-	-
40	0.30	-	-	-	0.53
41	0.30	-	-	-	-
46	-	-	0.20	-	-
63 ~ 92	-	0.36 (1)	0.60 (3)	0.53 (1)	-

表五、SCA8 CTG 擴增片段的定序分析結果

Subject	Age /Sex	Repeat no.	Repeat sequence	Diagnosis
H600	60/F	92	CTA ₇ CTG ₂ CTACTGCTACTG ₈₀	PD
B174	67/M	65	Not available	SCA3
F377	67/F	63	CTA ₁₂ CTG ₅₁	AD
3597	65/M	88	Not available	PD
H1173	52/F	84	CTA ₉ CTG ₇₅	PD

表六、FACS 分析 pEF-SCA8/(CTG)_n-hrGFP (n=0, 23, 88, 157)在 P19 細胞中表現情形。表中以 SCA8-CTG₀ 質體之 hrGFP 表現量作為 100%，來換算出其他組 hrGFP 之表現程度；SD 表示標準差。

重組質體	(%)	SD
pEF-SCA8/CTG ₀ -hrGFP	100.00	4.01
pEF-SCA8/CTG ₂₃ -hrGFP	54.69	4.69
pEF-SCA8/CTG ₈₈ -hrGFP	54.69	2.41
pEF-SCA8/CTG ₁₅₇ -hrGFP	62.50	5.05

表七、FACS 分析 pCMV-TBP-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形。表中以 pCMV-TBP-EGFP 和 pEF-SCA8/CTG₀ (即 TBP + -R) 共轉後之 EGFP 表現作為 100%，並換算出其他組相對應之比例；SD 表示標準差

	1 : 1	SD	1 : 3	SD	1 : 5	SD	1 : 7	SD
	(%)		(%)		(%)		(%)	
TBP + -R	100	0	100	0	100	0	100	0
TBP + 23	80.9	5.41	77.61	2.83	71.63	6.76	56.72	6.24
TBP + 88	68.46	3.62	60.52	8.68	52.39	6.36	57.19	5.66
TBP + 157	56.65	7.72	49.77	8.45	48.67	2.53	48.99	9.44
TBP + ORF3-88	79.33	7.49	81.38	7.52	84.5	7.04	86.31	9.59
TBP + ORF3-157	67.41	7.16	69.13	2.83	75.98	11.28	79.08	12.18

表八、FACS 分析 pCMV-36Q-EGFP 與 SCA8 重組質體共轉後其 EGFP 表現情形。表中以 pCMV-36Q-EGFP 和 pEF-SCA8/CTG₀ (即 36Q + -R) 共轉後之 EGFP 表現作為 100%，並換算出其他組相對應之比例；SD 表示標準差。

	1 : 1 (%)	SD	1 : 3 (%)	SD	1 : 5 (%)	SD	1 : 7 (%)	SD
36Q + -R	100	0	100	0	100	0	100	0
36Q + 23	81.15	1.53	75.02	1.51	66.03	3.64	64.83	3.64
36Q + 88	64.01	8.08	54.7	7.89	55.66	3.61	51.85	5.22
36Q + 157	62.28	10.05	46.35	12.14	49.89	2.08	47.08	10.67
36Q + ORF3-88	89.96	9.57	75.68	6.67	81.56	10.66	87.04	8.25
36Q + ORF3-157	80.81	5.47	65.87	8.84	57.6	5.68	67.04	7.3