

# 中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

第二名

052007

神經與精神疾病的樞紐- TAOK1 對神經系統相關基因表現的效應

學校名稱： 臺北市立第一女子高級中學

作者：  高二 林宜霈	指導老師：  蔡任圃
-------------------	------------------

關鍵詞： TAOK1、神經退化性疾病、神經心理疾病

## -摘要-

TAOK1 與神經發育與退化有密切關係，被證實會在阿茲海默症與帕金森氏症伴隨認知障礙的患者中大量表現，被視為一種可供診斷使用的生物標記。本研究透過細胞軸突型態與蛋白質表現，觀察到 TAOK1 過量表現會使分化中神經瘤細胞的軸突縮短，且  $\alpha$ -tubulin 和  $\beta$ -tubulin 的蛋白質表現量均下降，這可能是軸突縮短的原因之一。我們也發現 TAOK1 過量表現的細胞中，心理疾病相關基因(BDNF、MAO-A 和 MAO-B 等)的表現會顯著增加；與神經退化有關的 TDP-43 之 mRNA 表現量會顯著增加，而 pTDP-43 的表現量也有明顯上升。因此本研究的發現或許能為神經退化性疾病與心理疾病提供診斷與治療策略。

## 壹、前言

### 一、研究動機

在高齡與高壓的現代，神經退化性疾病(neurodegenerative diseases, NDs) 與精神性疾病(mental disorders, MDs)(表 1)為重要探討議題。常見的 NDs，如阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)和帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)，其病理特徵之一為神經元和突觸的喪失，通常由於異常蛋白質沉澱及神經發炎(neuroinflammation)所引起。其中，AD 是癡呆症(dementia)的主要原因，影響全球約 4500 萬人，並被列為全球第五大死因(Prince, *et al.*, 2015)。我們實驗室曾發現，在 PD 伴隨認知障礙病人(Parkinson's disease dementia)的血漿衍生的細胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)中，發現一種絲氨酸/蘇胺酸激酶--Thousand And One amino acid protein Kinase 1(TAOK1)異常的上調表現，另外也發現 AD 與 PDD 的患者中，也可發現 TAOK1 的異常上調(Kung, *et al.*, in preparation)。過去已有許多研究關於 TAOK1 在神經發育上的影響，例如：TAOK1 可做為 MAP3K 蛋白激酶，調控多種有絲分裂活化蛋白激酶途徑(mitogen-activated protein kinase pathways)(van Woerden, *et al.*, 2021)，TAOK1 也可做為一種細胞膜雕塑激酶，影響神經細胞的形態發生(Beeman, *et al.*, 2023)，TAOK1 的過少表現會導致發育延遲(developmental retardation)、智力下降等。此外，TAOK1 的異常增加會導致細胞死亡、病理性 tau 蛋白磷酸化，並進一步影響微管結構的動態性調節(Timm, *et al.*, 2003)。在過去研究中曾發現 TAOK1 不只對 AD 和 PD 產生影響，對於肌萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的標誌蛋白 TDP-43 也會有影響(Goh, 2024)。

在精神性疾病方面，憂鬱症(depression)在老年人口中雖僅佔 2.6%，是各年齡層相對最少的比例，重度憂鬱(major depressive disorder, MDD)也是以青壯年為主，但看似不高的

盛行率，背後可能是由於社會成見，或年齡較大所帶來的健康問題，像頭痛、疲勞等常見憂鬱症症狀相當類似，這使老年人的憂鬱症更難以發現(Annual Report of the Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2022)。另外也有研究顯示異常的 TAOK1 表現會導致老鼠出現類自閉症的行為(autism-like behavior)(Wang, *et al.*, 2023)，但目前仍不清楚，TAOK1 是否在神經心理性疾病相關蛋白的表現中，扮演了重要的角色？

表 1 神經性疾病與(neurodegenerative diseases, NDs)與精神性疾病(mental disorders)的比較。

項目	神經(退化)性疾病 (neurodegenerative diseases, NDs)	精神性疾病(Mental disorders, MDs)
定義	因特定的神經元逐漸失去功能或死亡，導致相應結構發生慢性進行性病變及功能障礙的疾病	因心理功能失調而造成的感知、思維、情感、行為、意志等精神活動的紊亂或異常
病因	通常為神經細胞退化、死亡、蛋白質異常累積等生理變化	可能與心理壓力、基因、環境、神經化學物質失衡有關
常見疾病	阿茲海默症、帕金森氏症、亨丁頓舞蹈症、肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)等	憂鬱症、焦慮症、雙極性障礙、精神分裂症、強迫症等
病程發展	多為漸進性惡化，不可逆	不一定惡化，可能反覆發作，但可逆性較高
診斷方式	倚賴腦部影像(MRI、PET)、腦脊液檢查、神經功能測試等	倚賴精神評估、問卷、臨床訪談等心理方式，較少影像依據
治療重點	延緩神經退化、改善運動或認知功能	穩定情緒、改善思考行為模式

(資料來源：Neurodegenerative\_disease, 2025、Mental\_disorder, 2025)

二、研究背景

本研究室之前置實驗發現 TAOK1 與失智症患者之關聯性，以及 TAOK1 於神經細胞株 (SH-SY5Y) 中造成細胞凋亡與神經突縮短、造成其他神經病變相關基因表現變化之現象。我因此收集、整理以下神經病變相關蛋白之資料，選擇候選基因以測試其受到 TAOK1 過量表現影響之可能性。

(一)、Thousand And One amino acid protein Kinase 1 (TAOK1)

TAOK1 是一種關鍵的蛋白激酶，TAOK1 可調控細多項胞訊息傳遞(圖 1)，進而影響細胞骨架重組、細胞凋亡、DNA 受損與壓力反應、免疫相關細胞激素的反應、細胞的增生與

分化等(Fang, *et al.*, 2020)。在 MAPK 途徑中，TAOK1 作為 MAP3K 家族成員，磷酸化下游 MAP2Ks，活化 ERK、p38 等訊息傳遞路徑；Hippo 途徑中，則透過磷酸化 Mammalian Ste20-like kinase (2MST2)，引發後續反應，進而調控細胞的生長、增殖和凋亡(Meng, *et al.*, 2016)。TAOK1 作為蛋白激酶，也可透過磷酸化 tau 蛋白(Tau proteins)，影響其與微管結合，進而調控細胞骨架的動態平衡。在神經發育中，TAOK1 可促進軸突與樹突分支與突觸形成(synaptogenesis)，當 TAOK1 表現過少時，可能導致神經發育障礙。在 NDs 中，TAOK1 的異常表現可能導致 tau 蛋白過度磷酸化，進而形成神經纖維纏結(neurofibrillary tangles)；可能增加氧化壓力、調控神經炎症，包括 MAPK\_NF-kB、interleulin-17 (IL-17) 訊息傳遞路徑(Fang, *et al.*, 2020；Zhou, *et al.*, 2024)。

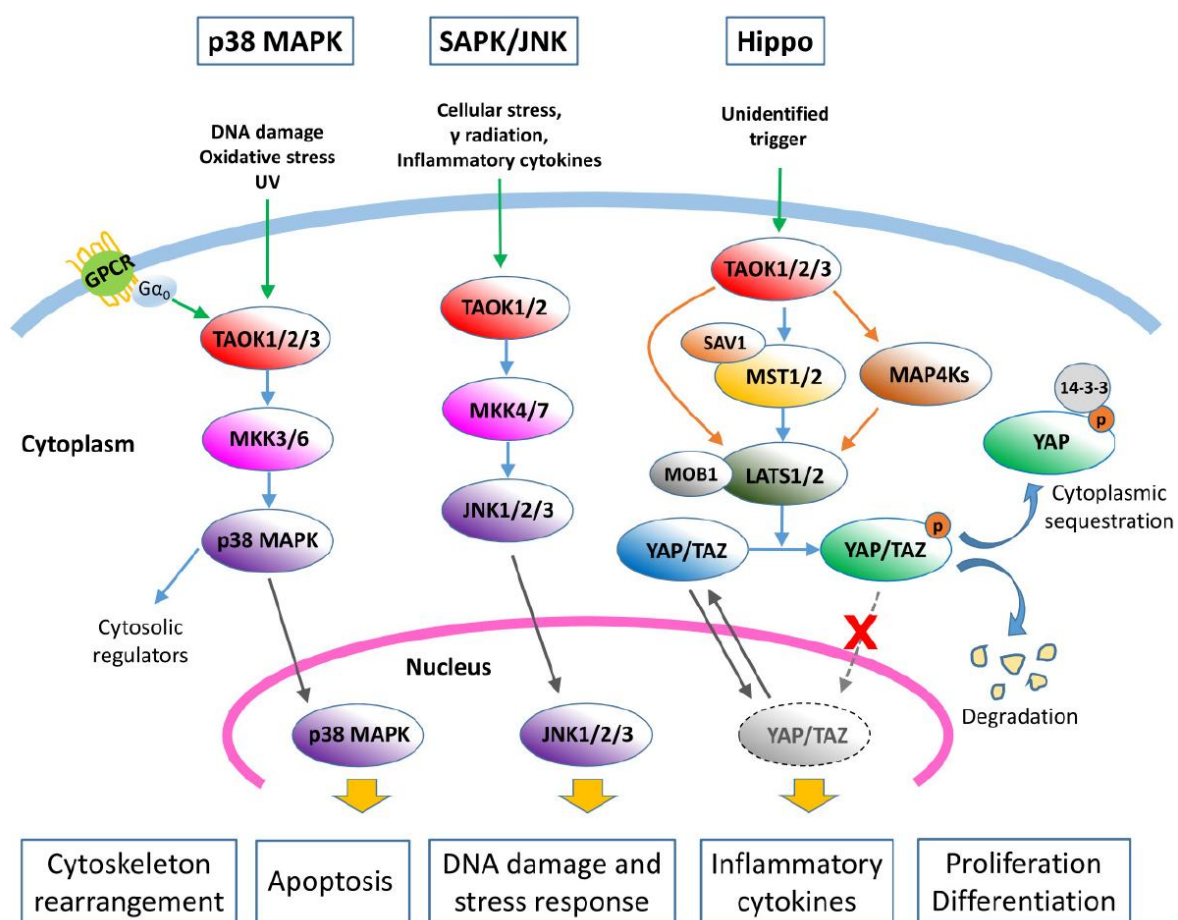


圖 1 TAOK 家族參與 p38 MAPK、SAPK/JNK 和 Hippo 訊號傳導途徑。

GPCR：G 蛋白偶聯受體；SAV1：Salvador 1。綠色箭頭：上游刺激；藍色箭頭：典型/經典途徑；橙色箭頭：Hippo 級聯反應中的替代途徑；灰色箭頭：核轉位/輸出(引用自 Fang, *et al.*, 2020)。

## (二)、tubulin associated unit (Tau)

**Tau** 蛋白是微管蛋白相關單位(tubulin associated unit)的縮寫，是一種微管相關蛋白，由四個主要區域組成，分別為 **N** 端投影區、富脯胺酸區、微管結合區和 **C** 端區域。正常情況下，**Tau** 蛋白促進微管的組裝與穩定，在軸突運輸中具有關鍵作用。從發育到成熟階段的 **Tau** 蛋白若高度磷酸化，會負向調控其與微管的結合(Goedert, 1998)，超過 40 個 **Tau** 蛋白官能基可被 **TAOK1** 磷酸化，包括微管結合區中的位點(Ser262、Ser324 和 Ser356)，與細胞生長、延伸和 **Tau** 蛋白與微管附著密切相關。例如，Ser262 磷酸化的 **Tau** 蛋白與  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin) 形成氫鍵，減弱與微管的結合(Kellogg, *et al.*, 2018)。

## (三)、乙型類澱粉蛋白(amyloid $\beta$ , A $\beta$ )

**A $\beta$**  是由更大的蛋白質：前類澱粉蛋白質(Amyloid precursor protein, APP) 分解而來，在許多組織中都能找到。**APP** 透過  $\alpha$ -分泌酶 (非澱粉樣蛋白生成途徑) 或  $\beta$ -分泌酶 (澱粉樣蛋白生成途徑) 切割，最終產生 **P3** 或 **A $\beta$** 。**A $\beta$**  單體聚集成各種類型的組裝體，包括寡聚體、原纖維和澱粉樣蛋白纖維。澱粉樣蛋白纖維較大且不溶，可進一步組裝成澱粉樣斑塊，而澱粉樣寡聚體可溶且可在大腦中擴散。澱粉樣蛋白級聯假說(amyloid cascade hypothesis)提出 **A $\beta$**  聚集成斑塊會導致神經毒性和癡呆(Hensley, *et al.*, 1994)。**A $\beta$**  分泌至細胞外後，首先寡聚成不同的可溶性物質，再將其構像轉化為原纖維，形成澱粉樣蛋白斑。**A $\beta$**  聚集體與 **tau** 蛋白相互作用以發揮毒性，導致神經元死亡和功能障礙。

## (四)、 $\alpha$ -突觸核蛋白( $\alpha$ -synuclein)

$\alpha$ -synuclein 是路易氏體(Lewy bodies)中重要的蛋白質。病變神經元和神經末梢中沉積的路易氏體是 **PD** 的病理標誌。不同大腦區域的神經中，異常的  $\alpha$ -synuclein 聚集同樣是帕金森氏症的病理標誌。同時， $\alpha$ -synuclein 也與路易氏體失智症(dementia with Lewy bodies) (Ayers, *et al.*, 2022)、多系統退化症(multiple system atrophy) (Woerman, *et al.*, 2018)、純自主神經衰竭(pure autonomic failure) (Bhattacharjee, *et al.*, 2021) 和快速動眼期睡眠行為障礙(REM sleep behavior disorder, RBD) (Högl, *et al.*, 2018)等神經疾病相關。

## (五)、TAR 去氧核糖核酸結合酶-43 (TAR DNA-binding protein 43 kDa, TDP-43)

**TDP-43** 在神經元和神經膠細胞中的異常聚集，是 **ALS** 和額顳葉癡呆症(frontotemporal dementia, FTD) 的明確病理標誌(Arseni, *et al.*, 2022)。在 **NDs** 中也很常見，包括 **AD** 和 **PD**。研究指出，**TDP-43** 與 **A $\beta$**  相互作用，抑制纖維化，使 **A $\beta$**  維持在毒性較高的階段(Shih, *et al.*, 2020)。

## (六)、腦源性神經營養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)

**BDNF** 是大腦中含量相當豐富的一種神經營養因子(neurotropic)，在神經元存活與生長

中發揮重要作用，並有助於神經可塑性(neuroplasticity)，對學習與記憶至關重要。BDNF 表現減少見於許多疾病，如 AD、PD、亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease)和雙相情緒障礙症(bipolar disorder) (Bathina and Das, 2015)。體能訓練可增強大腦 BDNF 水平，從而改善憂鬱症(Smith, *et al.*, 1995)。另外，在自閉症患者中觀察到 BDNF-Akt-Bcl2 抗凋亡訊號路徑下調(Wakabayashi, *et al.*, 2010)。

#### (七)、單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)

MAO 是催化單胺類物質氧化去胺反應的酶，為主要負責單胺類神經傳遞物質(去甲基腎上腺素、腎上腺素、血清素和多巴胺)降解的酵素，存在於粒線體的外膜上，以肝、腦與腎等組織含量最高。主要有 MAO-A 及 MAO-B 兩種亞型，其功能及特徵整理如下

##### 1. MAO-A

MAO-A 有三種常見的多態性：(i) 啟動子可變數目串聯重複多態性 (uVNTR)、(ii) cDNA 序列第 941 位的 G/T 多態性，外顯子 8 中的沉默突變，和 (iii) 內含子 2 中的二核苷酸重複 (MAOA-CA)，後者為本研究主要研究對象。研究顯示，不同的多態性等位基因可能在 MDD 和 bipolar disorder 中發揮不同的關鍵作用(Fan, *et al.*, 2010)，而嗎氯貝胺(moclobemide)是一種 MAO-A 抑制劑，用於治療憂鬱症。

##### 2. MAO-B

主要在腦、肝細胞與血小板中表達，重度憂鬱症患者前額葉皮質中，MAO-B 分布體積顯著升高(Moriguchi, *et al.*, 2019)。MAO-B 抑制劑可作為帕金森氏症的輔助治療劑。

#### (九)、SH-SY5Y 細胞株

本實驗所使用的為 SH-SY5Y 細胞株。SH-SY5Y 細胞株源自人類神經母細胞瘤 (neuroblastoma)，具有多巴胺能神經元的特性，且在誘導下能夠分化成更成熟的神經元樣細胞，故常用於神經類疾病的研究，如 PD、AD 等。

綜上所論，我們實驗室過去的研究發現 AD 等認知障礙中，過量表現的 TAOK1 可能會增加 TDP-43 的 mRNA 表現；而過去研究顯示 TAOK1 表現量過低，可能導致如自閉症等，和神經發育相關的心理疾病。因此我提出實驗假設，認為 TAOK1 為調控上述基因的重要相關因子，因此本研究將針對此假設進行探討。

## 貳、研究目的及研究問題

以誘導式均質基因型(inducible homologues)過度表現 TAOK1 之神經細胞株為材料，探討 TAOK1 是否為調控如 AD、dementia 等 NDs 或 autism、depression 等神經心理疾病相關蛋白的重要因子之一，並探索 TAOK1 表現量增加時，對 SH-SY5Y 突觸變化的影響，及其可能的機轉(圖 2)。

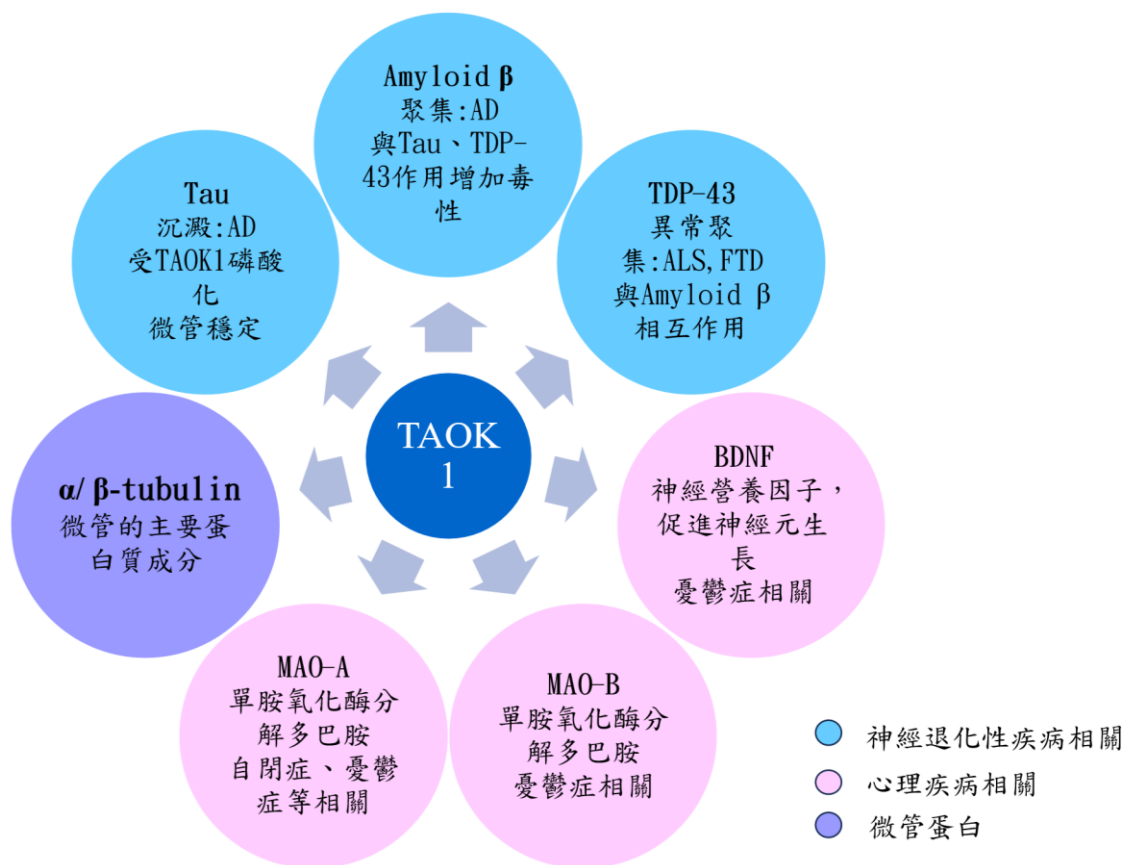


圖 2 研究架構圖：TAOK1 對神經退化疾病與心理疾病相關基因與蛋白質表現的效應 (作者自繪)。

## 參、研究過程或方法

### 一、實驗材料與方法

#### (一)、使用之細胞系

##### 1. Tet-On system

在 SH-SY5Y 中，利用 Tet-On Inducible system 以在特定分化階段增強 TAOK1 表現。使用 Tet-On 系統時，目標基因 TAOK1 會整合到宿主細胞的基因中，利用多西環素阻遏蛋白 (Tet repressor, TetR) 和 Tet 操縱子 (Tet operator, TetO) 結合，抑制下游基因表現；當多西環素 (又稱獨克士黴素, doxycycline) 加入培養基，將使 TetR 與 TetO 分離，促使目標基因表達 (圖 3)。

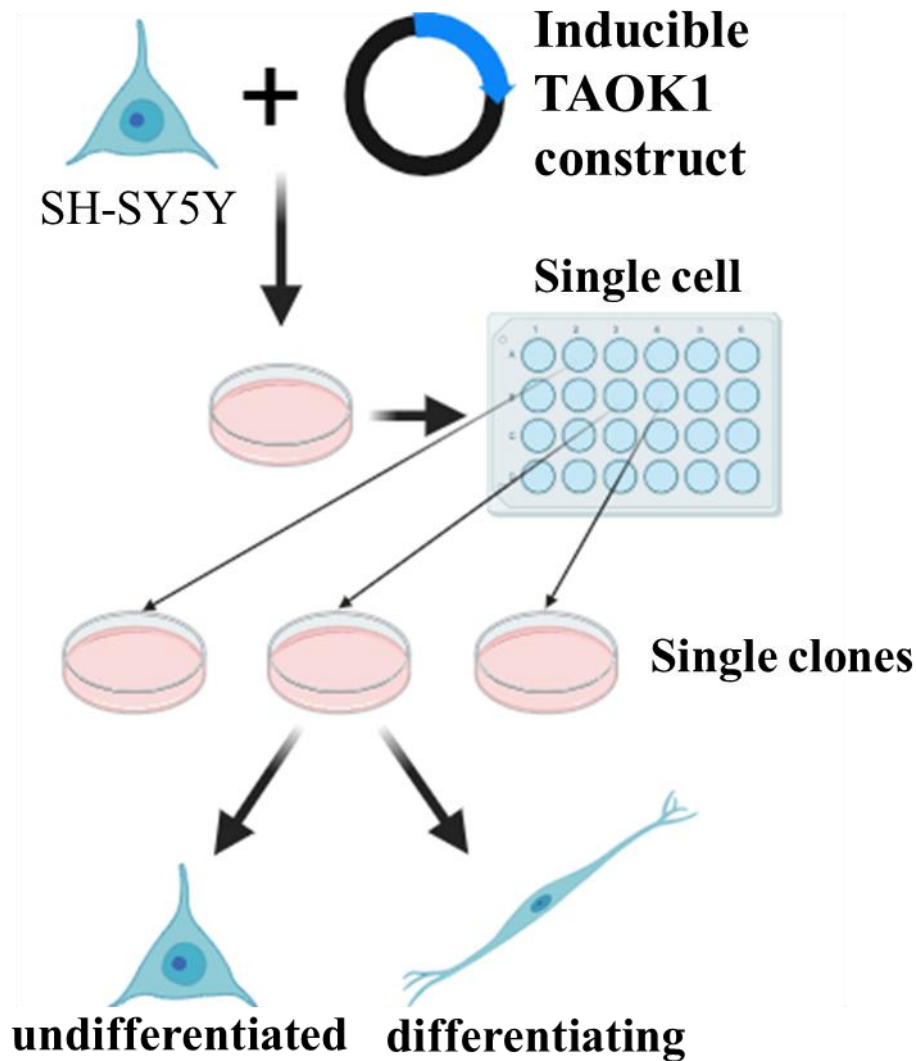


圖 3 以 Tet-On system 調控 TAOK1 表現的示意圖。

(作者以 BioRender 繪製)

## 2. 篩選出單細胞株 (single clone)

在本實驗中使用的 TAOK1-inducible SH-SY5Y 是由我們實驗室學姊所建立的單細胞株 (Kung, 2024)。由於 Tet-On 系統在過度表現時與其攝入的質體量密切相關，而細胞攝入質體量以及其嵌入位點不易控制，可能導致嵌入周圍的基因受損或表現量因此受影響，故需篩選出單細胞株，使實驗細胞可更穩定地表現 Tet-On 系統。另外再透過實驗多個細胞殖株，以確認我們所觀察到的差異並非為特例。

## 3. 細胞培養(cell culture)

本實驗是將 SH-SY5Y 培養於適當體積的培養基，組成成分為 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F 12; Gibco™, #11320033)並含有 10% heat-



inactivated FBS (Gibco™, #10437-028)，置於 37°C，10% CO<sub>2</sub> 的培養箱中。將細胞由液態氮中取出，先置於 37°C 水域約 1 分鐘，直到肉眼可見其解凍。準備 4 mL 的培養基於 50 mL 離心管中，將 1 mL 已解凍的細胞吸出，溶入培養基中。以 1000g，5 分鐘離心後，丟棄上清液，用 1 mL 培養基回溶後，依所需細胞量培養於培養皿中。若未進行繼代則約 2-3 天更新培養基，每次保留一半原先培養基，加入一半新鮮的，以減少細胞承受的環境變化。當細胞生長 3-5 天，密度達八至九成時，進行細胞繼代。繼代時，先以不含 Ca<sup>2+</sup> 與 Mg<sup>2+</sup> 之 DPBS 清洗細胞表面，再以 TrypLE 使細胞與培養皿表面分離，再 1000g，5 分鐘下離心，移除上清液後，用培養基回溶再加入新的培養皿中。繼代的量約為原盤之三成至五成。進行實驗組處理時，會更換所有培養基，並加入含有 5 µg/mL 的新鮮培養基，培養 3 天再進行樣品採集。細胞分化用培養基不同於一般的培養基，內容物為 Neurobasal™ Medium (Gibco™, #21103049) 包含 1X B-27™ (Gibco™, #17504044), 1X GlutaMax™ (Gibco™, #35050061) 及 10 mM of Retinoic Acid (RA) (Sigma, R2625)。當未分化細胞在培養皿中生長到三至四成時，將原本的培養基全部轉換成分化用培養基，每兩天更換，一次更換 50%。七天後，將培養基換回一般培養基，並於 TAOK1 誘導表現組中加入 5 µg/mL 的 doxycycline 誘導 TAOK1 表現。

## (二)、外型紀錄 (morphology observation)

利用 Leica DMI3000B 顯微鏡觀察並進行拍攝記錄。

## (三)、細胞計數 (cell counting)

利用台盼藍(trypan blue)在繼代時進行活細胞的細胞計數，使所採集的細胞數相近。將細胞以一定比例稀釋後，1:1 與 trypan blue 混合，取 10 µL 加入細胞計數器中，拿至 5 倍物鏡下觀察。

$$\text{細胞總數} = (\text{平均一格之細胞數}) \times 2 \times (\text{總液體體積}) \times (\text{稀釋倍率}) \times 10^4$$

## (四)、RNA 表現 (RNA quantification)

透過定量反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)測定樣品的 RNA 表現量。

### 1. RNA 純化 (RNA purification)

將 DPBS 加入培養皿，清洗細胞表面兩次，再加入 700 µL 的 TriRNA Pure Kit(TRP200)所提供的 GENEzol™ Reagent，於室溫下反應 5 分鐘以裂解細胞。加入 140

μL 的氯仿(chloroform)，置於室溫反應 3 分鐘，在 4°C 下離心 12,000g 15 分鐘。取出上層水相液體，並加入 1.5 倍體積之乙醇，混合均勻使 RNA 析出，RB Column 移入 2 mL Collection Tube。將 700 μL 的樣品溶液加至 RB Column 上，離心 14,000-16,000g 一分鐘，丟棄穿透液(flow-through)後，將 RB Column 移至新的 2mL Collection Tube。將 400 μL 的 Wash Buffer 加至 RB Column 上，離心 14,000-16,000g，30 分鐘。丟棄穿透液，添加 DNase I solution 於 RB Column 中央，室溫下反應 15 分鐘。加入 400μL Pre-Wash Buffer，離心 14,000-16,000g 30 秒，丟棄穿透液。加入 600 μL 的 Wash Buffer 離心 14,000-16,000g 30 秒，重複兩次。離心 14,000-16,000g 三分鐘。將 RB Column 移至 1.5 mL 離心管，加入 25-50 μL 的 RNase-free water，靜置三分鐘，離心 14,000-16,000g 一分鐘。

## 2. 反轉錄 (Reverse transcription)

將純化過的 RNA 以 SuperScript™ IV Reverse Transcriptase system (Invitrogen, #18090010)將 RNA 反轉錄成 DNA。將 1000 ng 總 RNA，用 RNase free water 將 RNA 補足至 8 μL。為將樣品中的殘留的 DNA 去除，將樣品進行 DNase 處理:在 8 μL 的樣品中加入 1 μL DNase 和 1 μL RDD Buffer (Qiagen, #79254)，於室溫下反應 30 分鐘。在樣品中加入 1 μL 25 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) 來使 DNase 活，並使用聚合酶連鎖反應 (PCR) 儀器 (Biometra TAdvanced Twin PCT Thermal Cycler) 將混合物在 75°C 下反應 10 分鐘。加入 1μL 隨機引子(random primer)和 1 μL 去氧核糖核苷三磷酸(dNTP)，在 PCR 儀器中，65°C 下反應 5 分鐘。在樣品中，加入 1 μL 二硫蘇糖醇 (DTT)、4 μL 的 5x SSIV 緩衝液和 1μL 的 SSIV 反轉錄酶，和 1μL RNase-free water。為驗證樣品是否有被 DNA 污染，建立一個非反轉錄(non-RT)的對照組:不添加 1 μL 的 SSIV 反轉錄酶，改為加入 2 μL 的 RNase-free water。將上述兩組置於 PCR 儀器，溫度設置為 23°C 10 分鐘、50°C 30 分鐘、80°C 10 分鐘，最後冷卻並保持在 4°C。完成後可將樣品保存於-20°C 或-80°C。

## 3. 即時聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction RT-qPCR)

將上一步完成之 cDNA 家 RNase-free water 稀釋至 2 ng/μL。將順向引子與反向引子 1:1 混合，加入 18 倍之純水(順向引子:反向引子:水=1:1:18)形成引子混合液，以 1:9 與 SYBR Master Mix 混合，形成 RT-qPCR 所需的混合液。在 384 孔盤中，先加入混合液 5 μL 每格，再加入稀釋過的 cDNA 5 μL，使最後上機時 cDNA 濃度為 1ng/μL，所有操作完成後貼膜於 4°C 離心 2,000 rcf 1 分鐘。在 qPCR 儀器(Bio Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler, CFX483™ Real-Time System)中，進行反應。我們利用  $\Delta\Delta C_t$  的方式分基因表現

量。將要觀察的基因之 Ct 值以內部基因(internal control)的 Ct 值進行標準化。

$$\Delta Ct = [(目標基因的Ct值) - (內部基因的Ct值)]$$

$$\Delta\Delta Ct = [(目標基因的\Delta Ct值) - (控制組的\Delta Ct值)]$$

實驗組之 RNA 表現量為控制組的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍。

#### (五)、蛋白質表現量的評估 (evaluation of the protein expression)

我們利用西方墨點法(Western blot)與細胞免疫螢光染色(Immunofluorescence Cytochemistry, ICC)觀察樣品蛋白質的表現量、分佈與位置轉換。

##### 1. 蛋白質萃取 (protein extraction)

首先配置裂解緩衝液(lysis buffer)，1000  $\mu$ L 的 1X RIPA buffer 中，加入 10  $\mu$ L 的 100X phosphatase inhibitor A (PhIA)、10  $\mu$ L 的 100X phosphatase inhibitor B (PhIB)、5  $\mu$ L 的 200X protease inhibitor (Prol)和 5  $\mu$ L 的 200X PMSF。

將細胞由培養箱取出，丟棄其內培養基，用 DPBS 清洗兩次，加入配好的裂解緩衝液，反應一段時間後，利用乾淨的細胞刮棒將培養皿中物質更好的離開盤面。將樣品一入微量離心管，4°C 離心 16,000g 20 分鐘。保留上清液於心的微量離心管中。

##### 2.蛋白質定量 (Bicinchoninic acid assay, BCA)

以蛋白質濃度 2000 ng/mL, 500 ng/mL, 125 ng/mL, 31.25 ng/mL,與 0 ng/mL 作為標準曲線以及一個空白對照組，內容物為裂解緩衝液。BCA 反應溶液是由 reagent A 和 reagent B 以 25:1 的比例混合。將蛋白質進行五倍稀釋後，取 15 $\mu$ L 與 200 $\mu$ L 的 BCA 反應溶液混合。將其移至 37°C 反應 30 分鐘。透過檢測樣品與標準液在 562 nm 的吸光值，得到樣本的濃度。

##### 3.西方墨點法與轉染與抗體染色 (Western Blot, Transfer & Antibodies)

配置一定濃度的電泳用膠體後，將樣本稀釋、加入染劑、加熱變性後，加入膠體中，以 50V 30min，100V 1hr 進行電泳，結束後將膠體與 PVDF membrane 接觸以 360 mA 進行轉染一小時，取出轉染 PVDF membrane 以 PBST 清洗兩次，再加入 blocking buffer (5% silk milk in PBST)一小時，再以 PBST 清洗膜的表面三次，再加入一級抗體，至於 4°C 浸泡過夜。隔天將一級抗體倒出後，以 PBST 清洗三次，加入二級抗體(in blocking buffer)浸泡兩小時，將二級抗體倒出後，再以 PBST 清洗後，在表面加上顯影劑後進行拍攝。

#### (六)、無 rRNA 之 RNA 定序(rRNA-Depletion RNA Sequencing)

透過純化後，交由 Genomics BioSci &Tech. Co. Ltd.分析之 RNA 定序結果，更大範圍

的檢視受 TAOK1 影響的基因(Goh, 2024)。

二、使用器材

表 2 實驗使用到之一級抗體(primary antibodies)與二級抗體(secondary antibodies)

抗體目標	物種	產品編號
Amyloid $\beta$	Mouse	82E1
GAPDH	Rabbit	10494-1-AP
M2 FLAG	Rabbit	#2368
P-Tau(Ser 262)	Rabbit	GTX50175
pTDP-43	Mouse	66318-1-1g
TAOK1	Rabbit	16806-1-AP
Tau	Mouse	ab80579
TDP-43	Rabbit	17082-2-AP
TuBB3	Mouse	66675
$\alpha$ -synuclein	Rabbit	ab138501
$\alpha$ -tubulin	Mouse	ab7291
$\beta$ -actin	Rabbit	IR2-7
Mouse IgG HRP	Goat	31430
Rabbit IgG HRP	Goat	31460

表 3 為 RT-qPCR 所使用的引子(primer)

Gene Symbol		Primer Pair
GAPDH	F	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT
	R	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG
XPNPEP1	F	GAC AAA GCT GAG GAG TTT CGC AG
	R	GAC AAG GTC CTA TTC GTC TCA GG
TAOK1	F	GGC GTC ATA ACT TAG AGC AGG AC
	R	TTG TGT TGA GGT GGC GGA ACT C
TDP43	F	CAA GCC ATT CAG GGC CTT TG
	R	TGC TTA GGT TCG GCA TTG GA
BDNF	F	TAA CGG CGG CAG ACA AAA AGA
	R	GAA GTA TTG CTT CAG TTG GCC T
MAO-A	F	TTC AGG ACT ATC TGC TGC CAA
	R	GGT CCC ACA TAA GCT CCA CC
MAO-B	F	GCT CTC TGG TTC CTG TGG TAT GTG
	R	TCC GCT CAC TCA CTT GAC CAG ATC
SCN1A	F	CTT CCC AAA GGC AAC GAG C
	R	CAG ATG GTG ATG GCC AGG TC

### 三、實驗流程(圖 4)

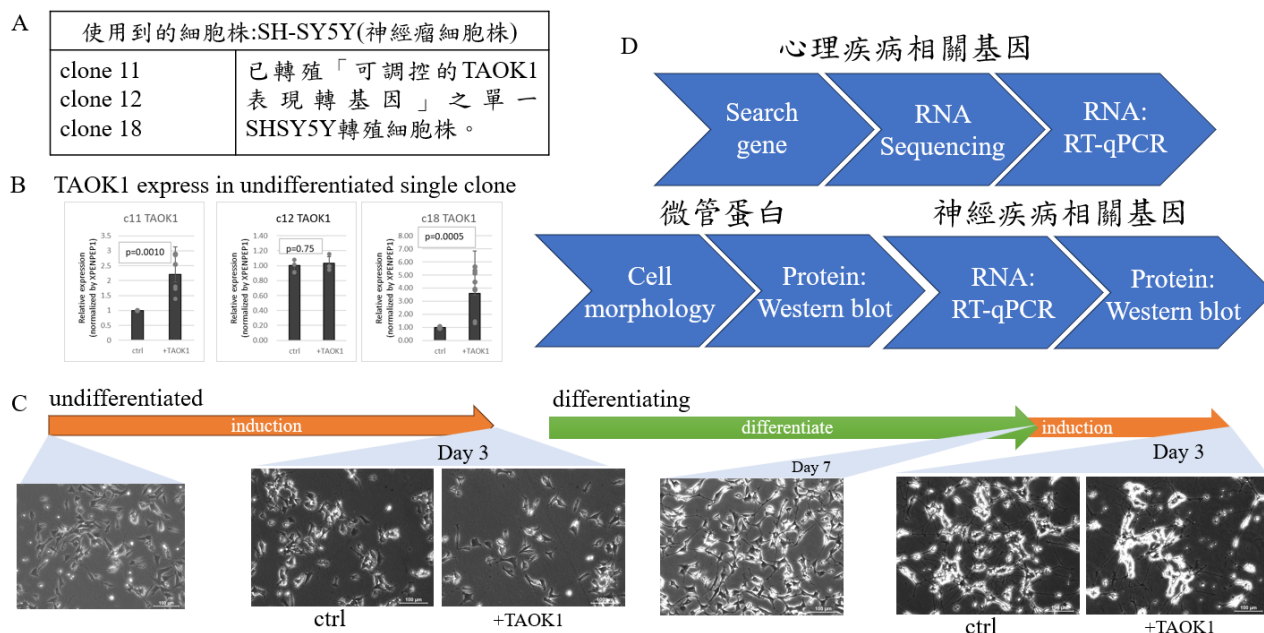


圖 4 TAOK1 於未分化與分化神經母細胞瘤細胞株 (TAOK1 可誘導型 SH-SY5Y 單細胞殖株) 之誘導與實驗方法 \*c11 代表 clone11, 為來自單一細胞的 SH-SY5Y 基因轉殖殖株, 具有相同基因序列, 並含有 TAOK1 可調控增加之轉殖基因(作者自繪或拍照)。

A.本實驗預計使用之單一細胞殖株, 包含 c11、12、18。

B.針對未分化的各個殖株進行 RNA 定量分析, 發現 c12 之 TAOK1 表現量並無增加, 因此後續實驗將以 c11 與 c18 為主。

C.細胞培養的時間流程與細胞大致型態。實驗上皆是取用誘導第三天之細胞進行 D.以不同目的區分之實驗流程, 主要針對細胞型態、RNA 與蛋白質進行分析。

D.本研究所探討的心理疾病、神經疾病與微管蛋白相關基因。

## 肆、實驗結果

### 一、TAOK1 過度表現對微管蛋白表現之影響

透過觀察 SH-SY5Y 分化後的細胞之軸突長度可以發現, 當 TAOK1 過度表現時, 細胞之軸突明顯縮短(圖 5)。已知軸突長度與微管蛋白密切相關, 因此我們針對微管蛋白表現進行分析, 並以 GAPDH、 $\beta$ -actin 作為內源基因(internal control)分析, 發現當 TAOK1 過度表現時, 不論是在未分化或以分化細胞中,  $\alpha$ -tubulin 與  $\beta$ -tubulin 兩者的蛋白質表現皆下降 (圖 6)。

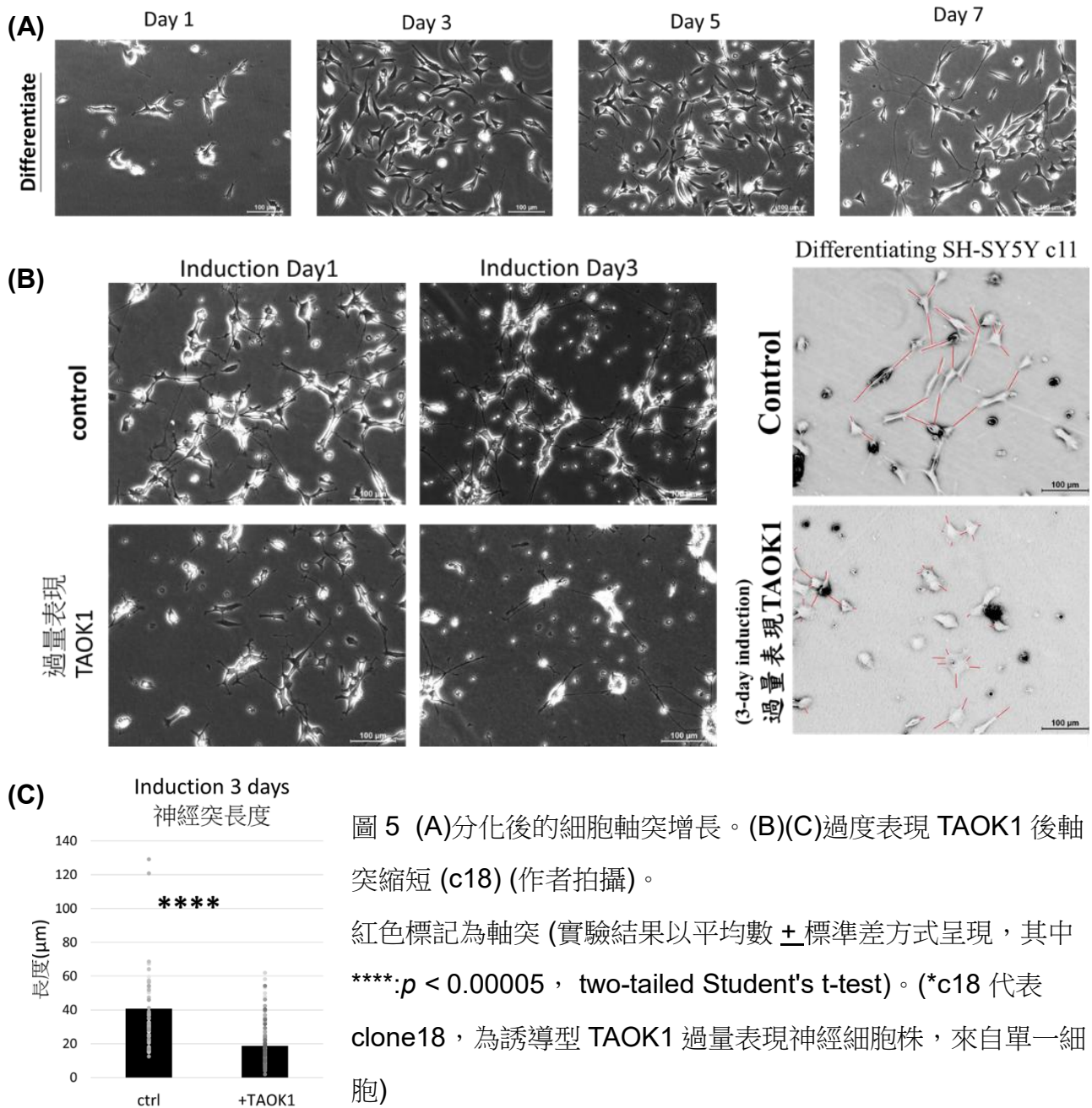


圖 5 (A)分化後的細胞軸突增長。(B)(C)過度表現 TAOK1 後軸突縮短 (c18) (作者拍攝)。

紅色標記為軸突 (實驗結果以平均數  $\pm$  標準差方式呈現，其中 \*\*\*\*:  $p < 0.00005$ ， two-tailed Student's t-test)。(c18 代表 clone18，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)

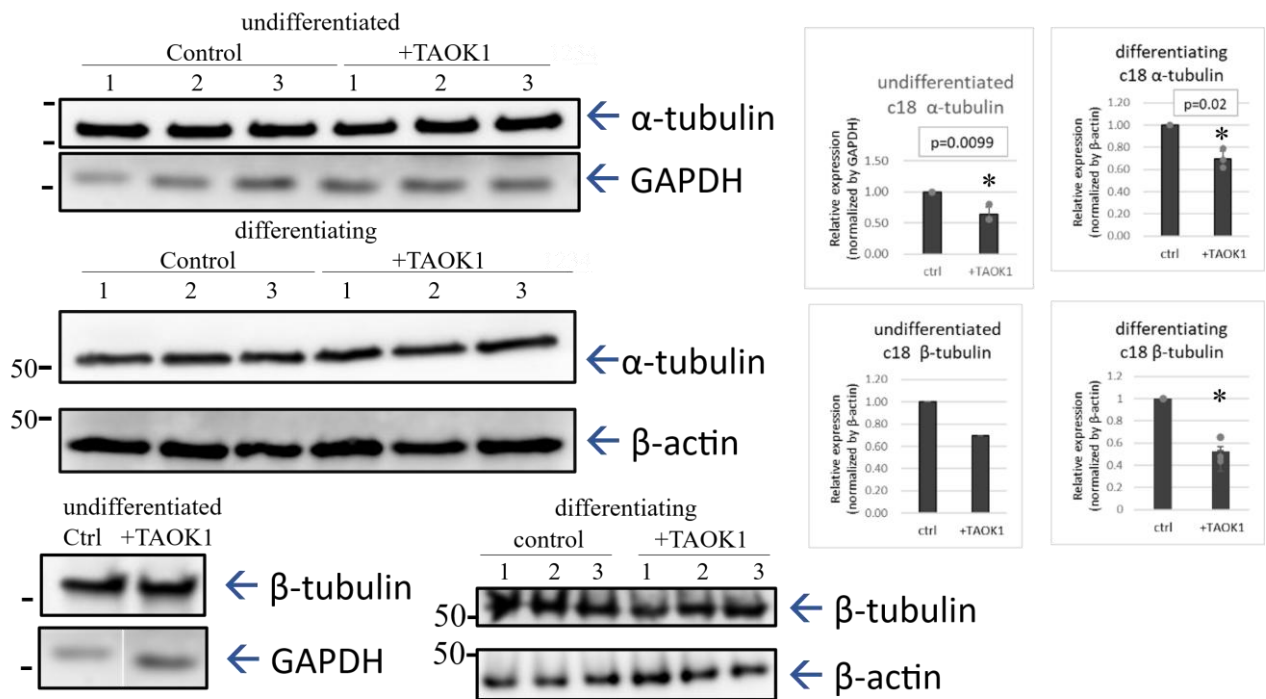


圖 6 透過 image J 進行定量分析：將  $\alpha$ -tubulin 與  $\beta$ -tubulin 的螢光亮度透過像素方式分析，再以未分化的控制組之 GAPDH 表現量作為標準化的基準。不論是在分化中或未分化， $\alpha$ -tubulin 與  $\beta$ -tubulin 在 TAOK1 過量表現時都顯著下降(由作者獨立完成)。(c18 代表 clone18，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)(ctrl:控制組，表示未受 TAOK1 過量表現影響)(實驗結果以平均數  $\pm$  標準差方式呈現，其中\*: $p < 0.05$ ，two-tailed Student's t-test)

## 二、TAOK1 過度表現與神經疾病相關基因之 RNA 與蛋白表現量之關係

由於我們實驗室已於人體實驗中得知 TAOK1 與認知障礙密切相關(Kung, *et al.*, in preparation)，我們首先檢視 TAOK1 與已知認知障礙相關蛋白的關聯。我們透過 RT-qPCR 發現，當 TAOK1 過度表現，TDP-43 表現量明顯上升。(圖 7)於是我對蛋白質層次分析，包含 TDP-43 及磷酸化的 TDP-43 (S409/410) (縮寫為 pTDP-43)，發現 pTDP-43 表現量會隨 TAOK1 過量表現而顯著增加。(圖 8)



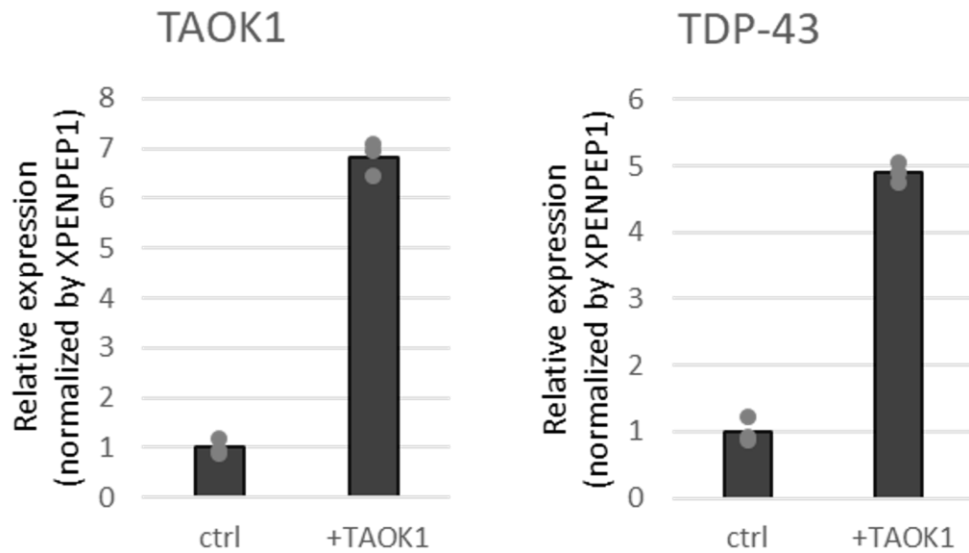
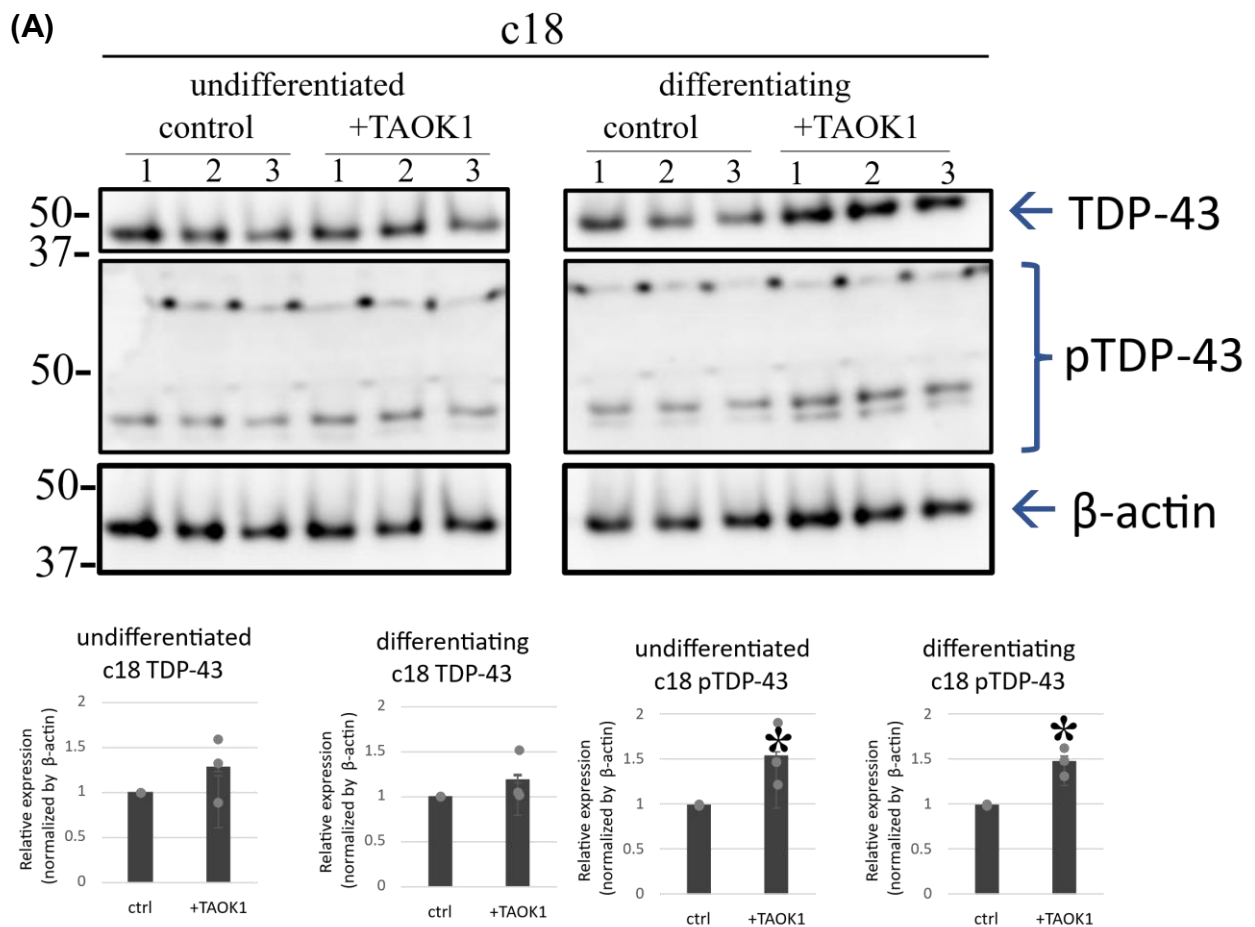


圖 7 在 TAOK1 過度表達後(左圖)，分化中的 SH-SY5Y 細胞中，編碼 TDP43 的 RNA (*TARDBP*) 表現量顯著增加(右圖) (作者自繪)





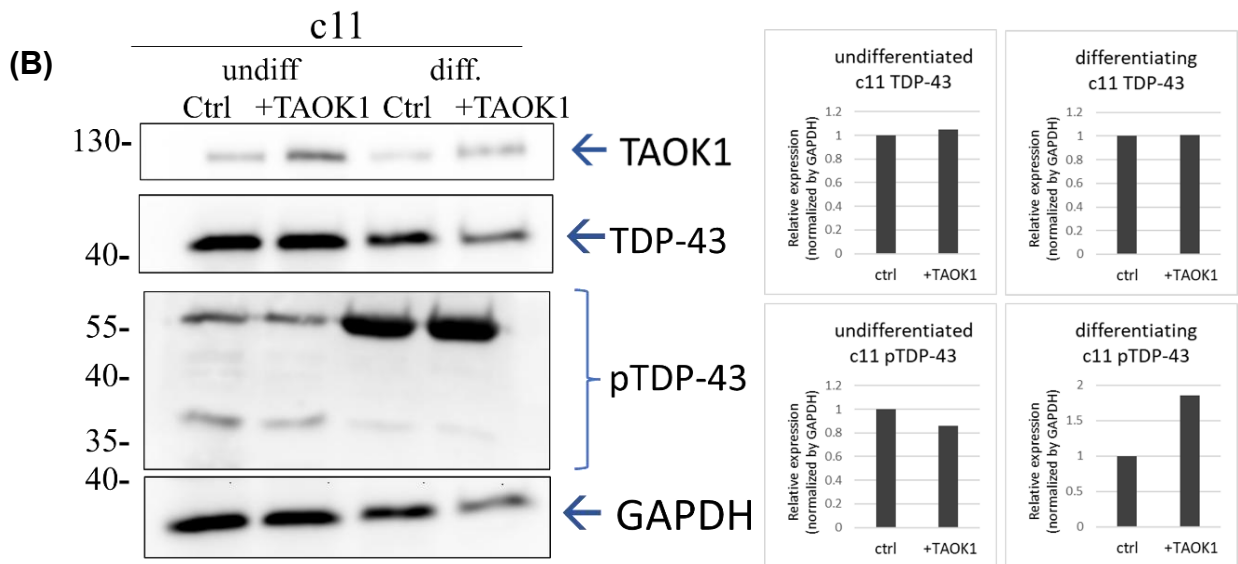


圖 8 西方墨點法分析 TDP-43 表現量與磷酸化 TDP-43 表現量:c18 分化中樣本的 TDP-43 表現量下降，而 c11 分化中的樣本之磷酸化 TDP-43 表現量上升

(A).c18 樣本與其統計分析結果。

(B).c11 樣本與其分析結果(由作者獨立完成) (實驗結果以平均數  $\pm$  標準差方式呈現，其中以 Student's t-test 進行統計)(\*c11 代表 clone11，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)

## 二、TAOK1 過度表現與心理疾病關係

透過前人 RNA 定序結果(Goh, 2024)，我發現數個基因在 TAOK1 過度表現時，其 RNA 表現量也會發生改變(圖 9、圖 10)。選取與心理疾病較相關且最廣為認同的假說的基因進行研究。我萃取出 RNA 後，進行 RT-qPCR 分析，發現 BDNF、MAO-B 在 c18 樣本中皆明顯增加，而 MAO-A 則是於 c18 樣本與 c11 樣本都有明顯隨 TAOK1 上升(圖 11)。另外，我將各樣本 TAOK1 與不同基因進行相關性的分析，發現未分化樣本中，MAO-A、MAO-B 與 TAOK1 有明顯的正相關，而分化中的樣本則是因為數據量不足而難以看出是否顯著，但 MAO-A 仍是呈現正相關(圖 12)。

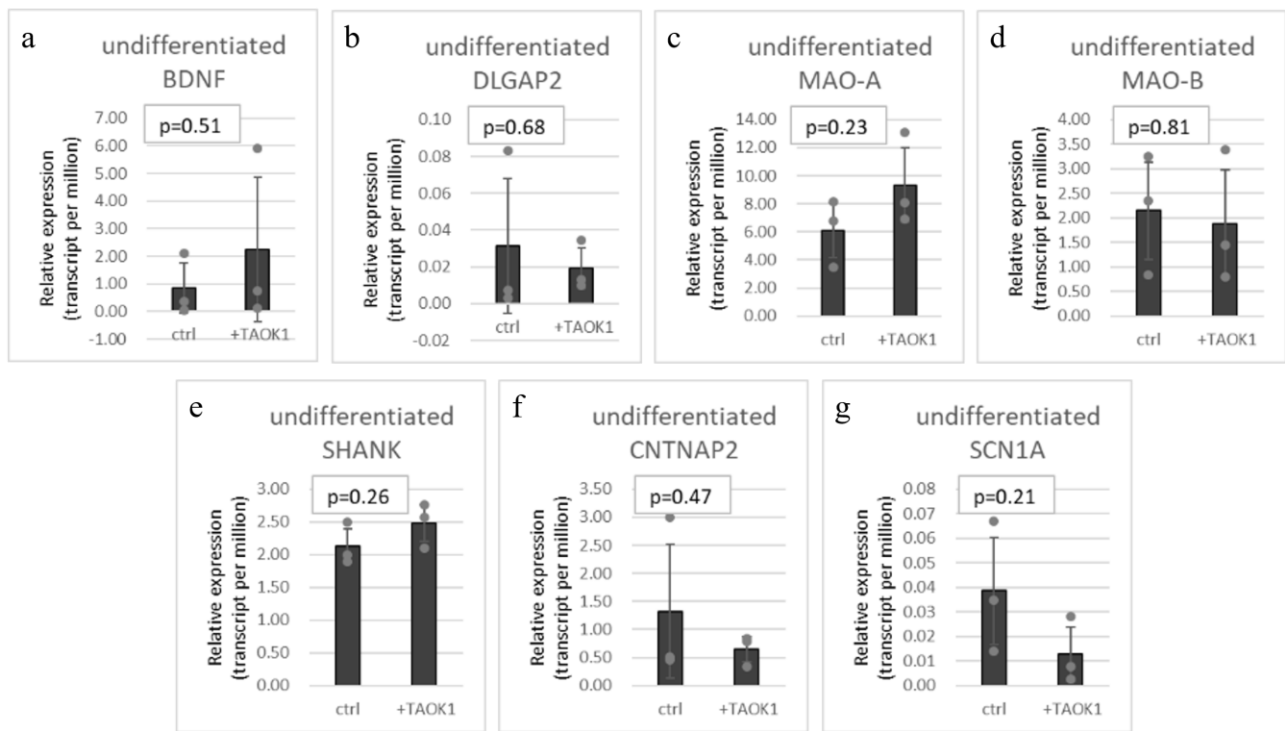


圖 9 TAOK1 對未分化神經細胞株中，數個與神經心理疾病相關基因表現的效應(數據引用自：Goh, 2024；數據分析與繪圖由本人完成) (n=3, 包含 c11、c17、c18, 未分化) (作者自繪) (實驗結果以平均數 + 標準差方式呈現，其中\*:  $p < 0.05$ ，two-tailed Student's t-test)。

- a. BDNF(與自閉症、憂鬱症相關)、
  - b. DLGAP2(與自閉症、思覺失調症相關)(Li, *et al.*, 2014)、
  - c. MAO-A(與憂鬱症、雙向情緒障礙相關)、
  - d. MAO-B(與憂鬱症相關)、
  - e. SHANK3(與自閉症相關)(Huang M, *et al.*, 2023)、
  - f. CNTNAP2(與自閉症、思覺失調症相關)(Rodenias-Cuadrado, *et al.*, 2014)、
  - g. SCN1A(與癲癇相關)。
- (\*c18 代表 clone18，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)

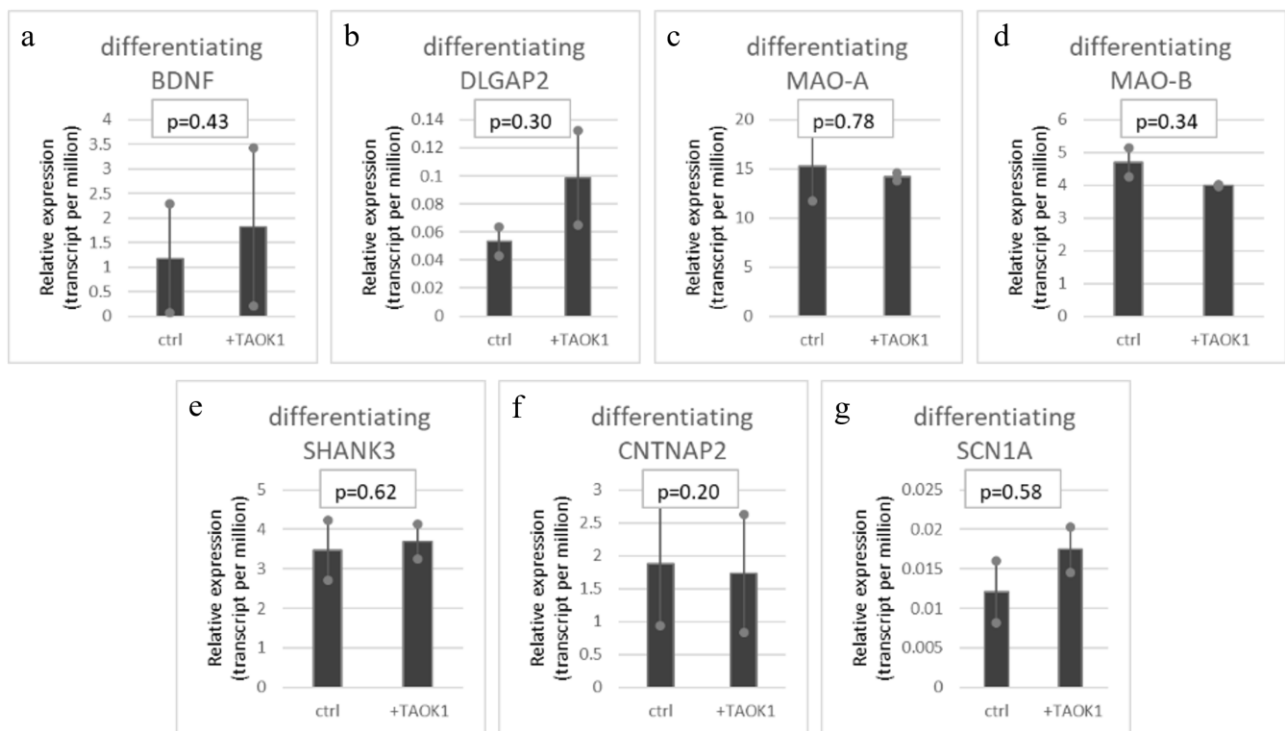


圖 10 TAOK1 對分化中神經細胞株中，數個與神經心理疾病相關基因表現的效應(數據引用

自：Goh, 2024；數據分析與繪圖由本人完成)(n=2, 包含 c18、Mix clone, 分化中) (作者自繪)(實驗結果以平均數  $\pm$  標準差方式呈現，其中\*:  $p < 0.05$ ， two-tailed Student's t-test)

a. BDNF、

b. DLGAP2、

c. MAO-A、

d. MAO-B、

e. SHANK3、

f. CNTNAP2、

g. SCN1A。(\*c18 代表 clone18，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)

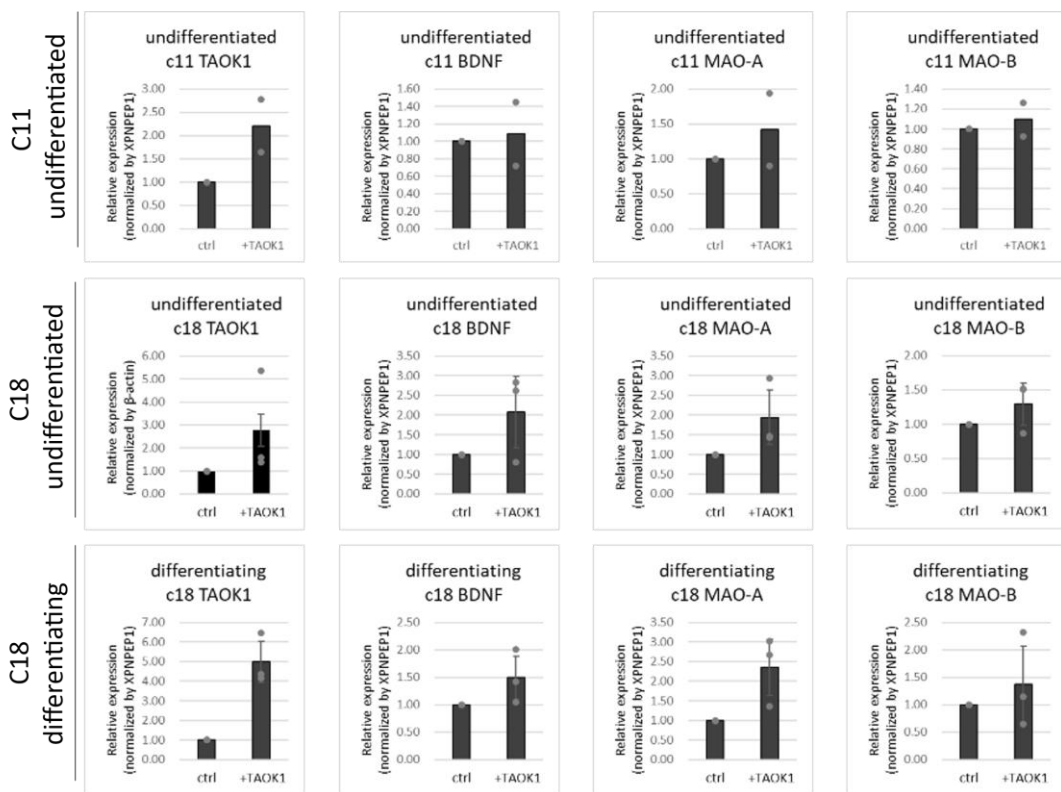


圖 11 進行 RT-qPCR，c11 中各基因僅有 MAO-A 表現較明顯上升，而 c18 樣本中，BDNF、MAO-A 與 MAO-B 表現量都有隨 TAOK1 過量表現明顯增加 (c11:n=2；c18 undifferentiated=3; c18 differentiating: n=3) (作者獨立完成)。  
(實驗結果以平均數 + 標準差方式呈現，其中\*:p < 0.05，two-tailed Student's t-test)(\*c18 代表 clone18，為誘導型 TAOK1 過量表現神經細胞株，來自單一細胞)

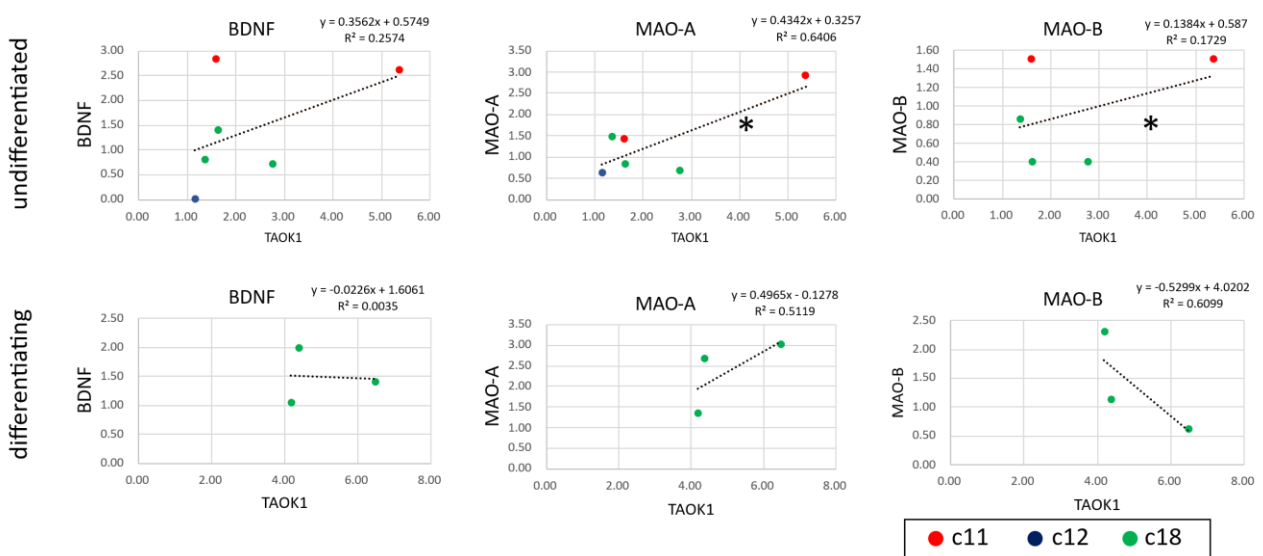


圖 12 對未分化、分化中神經細胞株中，TAOK1 與數個與神經心理疾病相關基因表現的回歸分析(\*: p < 0.05，Pearson 檢定)(未分化:n=6, 包含 c11、c18, 未分化)(分化中:n=3, 包含 c11、c18, 分化中)(坐標軸為實驗組相對對照組的表現量)(作者自繪)。

本研究的實驗結果，統整於圖 13。

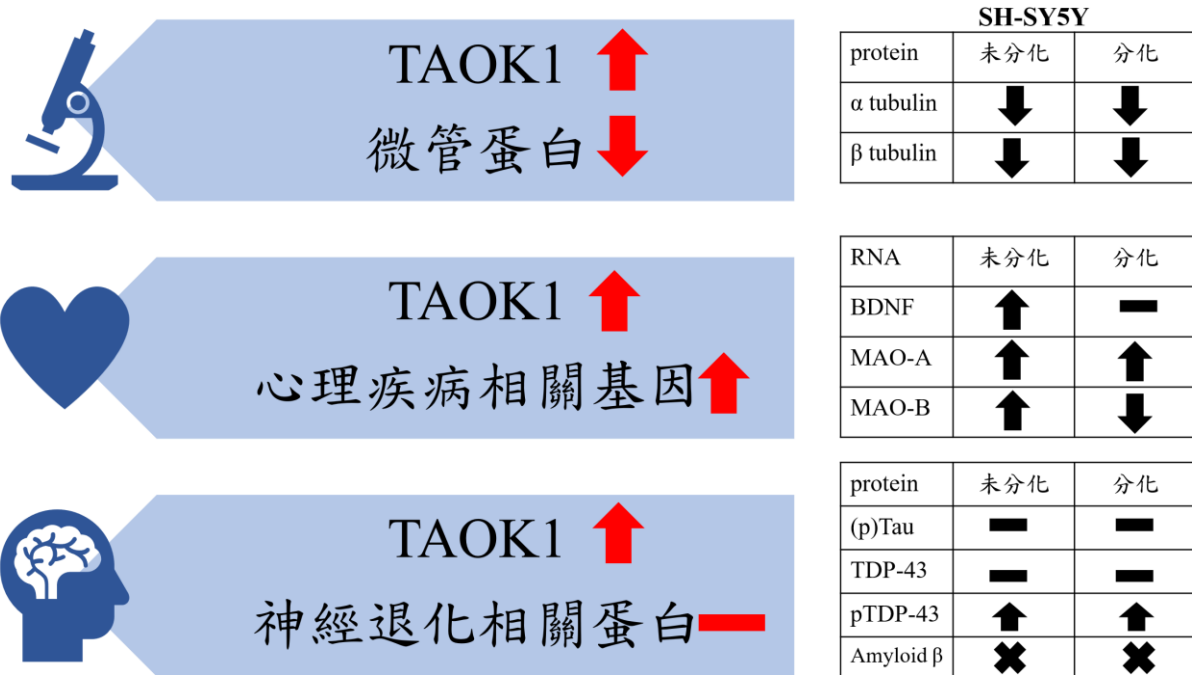


圖 13 實驗結果總整理。箭頭:表現量變化，橫線:表現量無顯著差異，叉號:無觀察到相關訊號 (作者自繪)。

## 伍、討論

透過上述實驗結果我們可以發現：當 TAOK1 過度表現時，神經細胞軸突會顯著縮短，而我所發現的微管蛋白表現下降可能就是其原因；神經心理疾病相關基因表現量會增加，可能使認知障礙發生時心理疾病伴隨著出現；神經退化性基因表現無顯著差異，可能是因為內源基因 GAPDH 同樣會受調節，這可能是神經退化性疾病中代謝異常的條控路徑之一。

### 一、TAOK1 與軸突與微管蛋白

當 TAOK1 過量表現時，可見細胞的軸突顯著縮短。已知神經細胞的軸突型態與神經的功能密切相關，包含訊息傳遞等都會受到影響。經過蛋白質電泳後的結果顯示不論是在分化或未分化細胞中， $\alpha$ -tubulin 與  $\beta$ -tubulin 的表現皆顯著下降。這可能是導致軸突縮短的原因，為潛在 TAOK1 影響神經退化的機制之一。因此此細胞系未來可能用於測試藥物，若能使 TAOK1 過量表現時的細胞軸突長度維持，則可能做為治療手段。

### 二、過度表現 TAOK1 對神經心理疾病相關基因表現量之影響

#### 1. 對 BDNF 表現量之影響

BDNF 為幸福感相關基因，當 TAOK1 過度表現時，其表現量也會顯著增加。目前針對研究認為增加 BDNF 的表現，可使憂鬱症改善。(Smith, et al., 1995)因此本實驗的結果我認為是在面對 TAOK1 過量所造成的壓力時，所產生的補償型保護機制，神經細胞透過增加 BDNF 的表現，來拮抗過度表現 TAOK1，所造成的壓力及神經傷害。

#### 2. 對 MAO-A 與 MAO-B 表現量之影響

MAO-A 與 MAO-B 皆為可分解多巴胺可單胺氧化酶。多巴胺為調節動機(motivation)和獎勵機制(reinforcement)的重要神經傳導物質。MAO-A 或 MAO-B 的可逆性抑制劑(reversible inhibitor)，被可當作抗憂鬱劑(antidepressant)使用。當 TAOK1 過量表現時 MAO-A 與 MAO-B 都會有顯著上升，兩者均可能導致多巴胺的過度或過快被分解，使得多巴胺的濃度及功能不足，這可能導致心理疾病伴隨與 TAOK1 相關的 NDs 同時出現。誠如研究動機所言，年長者的心理疾病常受到忽略，這便可能導致更嚴重的行為障礙。

### 三、TAOK1 與神經疾病

#### 1. 對 TDP-43 表現量和磷酸化之影響

由圖可以看到當 TAOK1 過度表現時，TDP-43 的 mRNA 表現量顯著增加，然而在蛋白質層次卻無顯著變化，與預期不符，表示在轉譯的過程可能有未知的調節機制，讓 mRNA 表現雖然顯著上升但蛋白質表現變化不明顯。

另外，磷酸化 TDP-43 在分化中的樣本有明顯上增加，而磷酸化被認為會導致 TDP-43

寡聚化(oligomerization)與纖維化(fibrillization)增加，是 ALS 和 FTLD-TDP 中發現的病理性指標。(Hasegawa, *et al.*, 2008) 另外，磷酸化 TDP-43 可能導致其錯誤定位至細胞質，使其失去原有功能。(Nonaka, *et al.*, 2016) 我也同樣分析磷酸化 TDP-43 佔全部 TDP-43 的量(圖 14)，可以發現當磷酸化 TDP-43 的表現量所佔的比例上升，顯示 TAOK1 過量表現可能透過 TDP-43 的異常，進而產生神經退化性疾病的病徵。目前已知會直接磷酸化 TDP-43 S409/410 位點的蛋白質包括酪蛋白激酶-1( casein kinase-1)和 p38 $\alpha$ ，TAOK1 可能會調控其上游基因而使 TDP-43 磷酸化增加。未來也將針對磷酸化的 TDP-43 進行 ICC 分析，研究其定位是否同樣受 TAOK1 影響。(Nonaka, *et al.*, 2016)

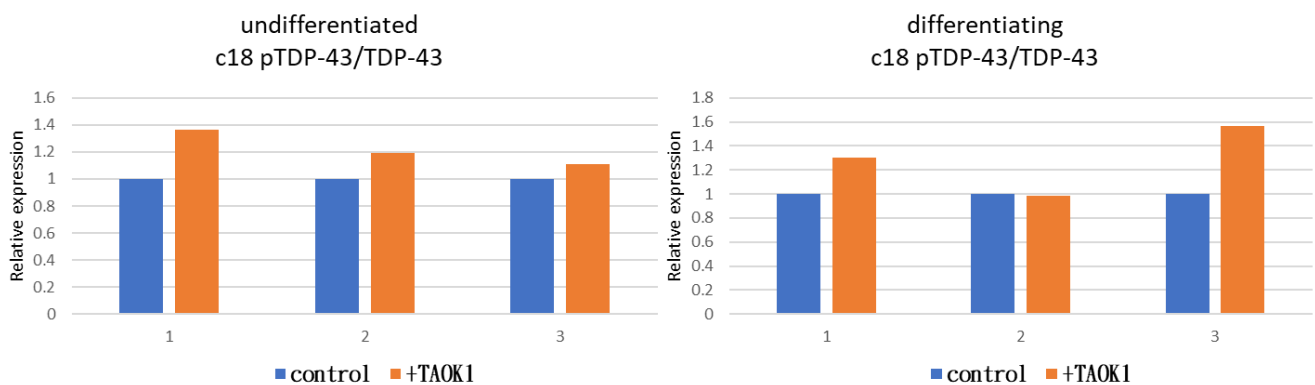


圖 14 以圖 8 中的樣本進行分析，發現磷酸化 TDP-43 佔 TDP-43 的比例會隨 TAOK1 過量表現而增加。(作者自繪)

本研究發現 TAOK1 對神經系統中許多與 NDs 與 MDs 有關的基因表現具有調節效應(圖 11)，展示了 TAOK1 作為 NDs 與 MDs 關聯性的橋樑，因此設計可控制 TAOK1 的活性或功能藥物，可能具備治療 NDs 與 MDs 的潛力，值得進行進一步的探討與深究。

未來可針對 TAOK1 對心理疾病相關基因進行更深入研究，包含其影響機制及蛋白質表現；另外 TDP-43 的蛋白質表現部分，也可嘗試研究不同位點的磷酸化，以及磷酸化後所出現在分子量大於 43 kDa 的地方的成因，目前推測的可能原因包含但不限於因磷酸化而產生的聚集，或磷酸化導致蛋白質電性改變，而使其出現在非預期的分子量處。

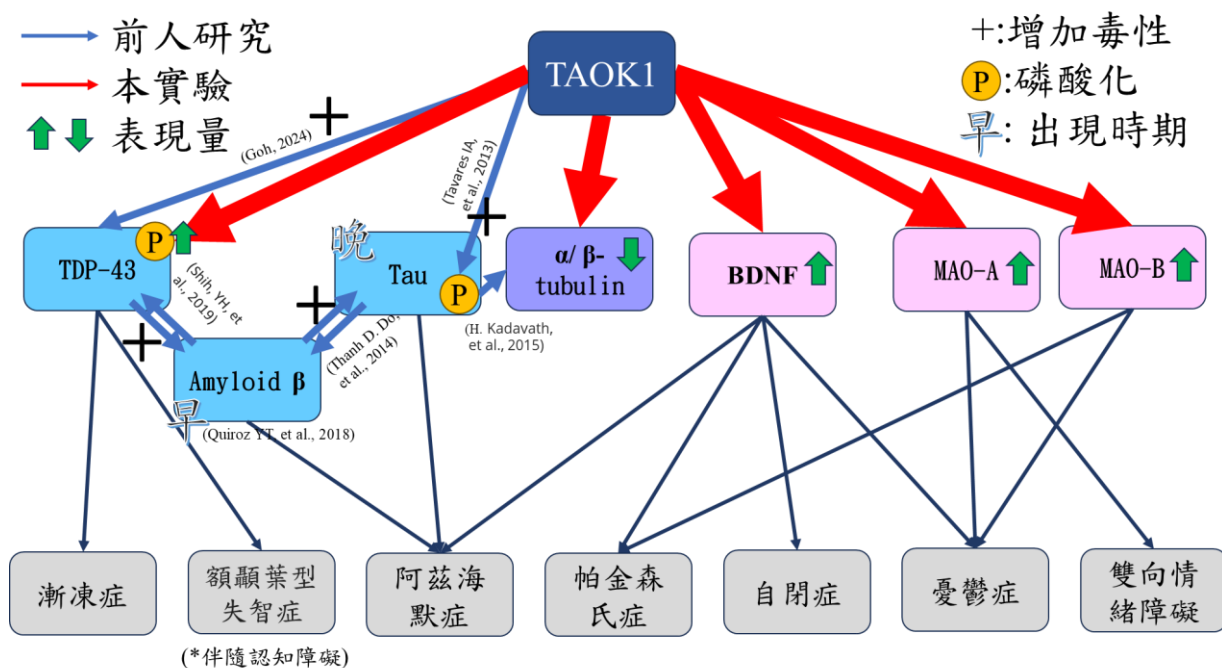


圖 15 實驗結果與疾病統整(作者自繪)。

## 陸、結論

本研究以人類神經母細胞瘤細胞株 SH-SY5Y 作為體外細胞模型，探討絲氨酸/蘇氨酸激酶 TAOK1 (thousand and one amino acid kinase 1) 對神經系統相關基因表現之影響。研究結果顯示，TAOK1 的過度表現會導致神經細胞軸突明顯縮短，且伴隨  $\alpha$ -tubulin 與  $\beta$ -tubulin 蛋白質表現量的下降，推測此現象可能為軸突發育受阻的潛在機制之一。此外，TAOK1 的過量表現亦會上調多種與神經精神疾病相關的基因，包括 BDNF、MAO-A 及 MAO-B 等，顯示其可能參與調控自閉症、憂鬱症及雙相情感障礙等疾病的分子機制。相較之下，對癲癇相關基因 SCN1A 的表現未見顯著影響，推測可能因其在 SH-SY5Y 細胞中表現量極低，導致 RT-qPCR 難以準確偵測。值得注意的是，TAOK1 過度表現亦顯著提升 TDP-43 的 RNA 表現量，但在蛋白質層級變化不顯著。然而，在細胞分化條件下，pTDP-43 表現顯著上升，且呈現異位定位至細胞質的現象，可能導致其功能喪失，進一步與神經退化病理相關。此外，TAOK1 過量表現亦可能調控代謝相關基因 GAPDH 的表現，特別在未分化細胞中呈現上升趨勢，可能對其他蛋白質定量結果產生干擾。

綜合上述實驗結果，本研究顯示 TAOK1 在調控神經細胞形態發育及神經精神疾病相關基因表現方面扮演關鍵角色。未來若能進一步釐清其作用機制，並發展針對 TAOK1 活性或功能的調控藥物，將有潛力作為新一代的神經退化與精神疾病之治療策略。



## 柒、參考文獻資料

- Arseni, D., Hasegawa, M., Murzin, A. G., Kametani, F., Arai, M., Yoshida, M., & Ryskeldi-Falcon, B. (2022). Structure of pathological TDP-43 filaments from ALS with FTLD. *Nature*, 601(7891), 139–143. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04199-3>
- Ayers, J. I., Lee, J., Monteiro, O., Woerman, A. L., Lazar, A. A., Condello, C., Paras, N. A., & Prusiner, S. B. (2022). Different  $\alpha$ -synuclein prion strains cause dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(6), e2113489119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113489119>
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of medical science : AMS*, 11(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Beeman, N., Sapre, T., Ong, S. E., & Yadav, S. (2023). Neurodevelopmental disorder-associated mutations in TAOK1 reveal its function as a plasma membrane remodeling kinase. *Science signaling*, 16(766), eadd3269. <https://doi.org/10.1126/scisignal.add3269>
- Bhattacharjee, S., & Alsukhni, R. A. (2022). Pure Autonomic Failure-A Localized Alpha Synucleinopathy with a Potential for Conversion to More Extensive Alpha Synucleinopathies. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 25(3), 340–346. [https://doi.org/10.4103/aian.aian\\_1078\\_21](https://doi.org/10.4103/aian.aian_1078_21)
- Ding, J., Li, X., Tian, H., Wang, L., Guo, B., Wang, Y., Li, W., Wang, F., & Sun, T. (2021). SCN1A Mutation-Beyond Dravet Syndrome: A Systematic Review and Narrative Synthesis. *Frontiers in neurology*, 12, 743726. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.743726>
- Do, T. D., Economou, N. J., Chamas, A., Buratto, S. K., Shea, J. E., & Bowers, M. T. (2014). Interactions between amyloid- $\beta$  and Tau fragments promote aberrant aggregates: implications for amyloid toxicity. *The journal of physical chemistry. B*, 118(38), 11220–11230. <https://doi.org/10.1021/jp506258g> .
- Fan, M., Liu, B., Jiang, T., Jiang, X., Zhao, H., & Zhang, J. (2010). Meta-analysis of the association between the monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Psychiatric genetics*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283351112>
- Fang, C. Y., Lai, T. C., Hsiao, M., & Chang, Y. C. (2020). The Diverse Roles of TAO Kinases in Health and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7463. <https://doi.org/10.3390/ijms21207463>

- Goedert, M. (1998). Neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Progress in brain research*, 117, 287–306.  
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)64022-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)64022-4)
- Goh, J. M. (2024). 探討 TAOK1 在 SH-SY5Y 神經母細胞中的神經毒性及神經炎症效應 [master's thesis, National Taiwan University]. Airiti Library.  
<https://doi.org/10.6342/NTU202402516>
- Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K. and Akiyama, H. (2008), Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.*, 64: 60-70. <https://doi.org/10.1002/ana.21425>
- Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A., & Butterfield, D. A. (1994). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3270–3274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3270>
- Högl, B., Stefani, A. & Videnovic, A. Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration — an update. *Nat Rev Neurol* **14**, 40–55 (2018).  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.157>
- Huang M, Qi Q, Xu T. Targeting Shank3 deficiency and paresthesia in autism spectrum disorder: A brief review. *Front Mol Neurosci* (2023) 16:1128974.  
doi: 10.3389/fnmol.2023.1128974
- Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), 7501–7506.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1504081112>.
- Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F., & Nogales, E. (2018). Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6394), 1242–1246. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>
- Kung, P. J. (2024). 巴金森病與認知功能障礙患者之體內與循環分子生物標記：從 piRNA 到細胞外泌體蛋白 [doctoral dissertation, National Taiwan University]. Airiti Library.  
<https://doi.org/10.6342/NTU202402784>
- Kung, P. J., Tsai, Y. T., Yu, R. L., Kuo, M. C., Wu, C. C., Hong, C. T., Ueda, K., Lin, S. P. and Wu, R. M. (in preparation). Elevated Levels of Extracellular Vesicle-Associated

TAOK1 in Plasma: A Diagnostic Marker for Cognitive Decline in Parkinson's Disease Dementia and Alzheimer's Disease. Sugmi. *Movement Disorder*. Manuscript submitted for publication.

- Li, J. M., Lu, C. L., Cheng, M. C., Luu, S. U., Hsu, S. H., Hu, T. M., Tsai, H. Y., & Chen, C. H. (2014). Role of the DLGAP2 gene encoding the SAP90/PSD-95-associated protein 2 in schizophrenia. *PloS one*, 9(1), e85373.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085373>
- Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development*, 30(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.1101/gad.274027.115>
- Mental\_disorder (2025, May 22). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved May 26, 2025, from [https://en.wikipedia.org/wiki/Mental\\_disorder](https://en.wikipedia.org/wiki/Mental_disorder)
- Moriguchi S, Wilson AA, Miler L, *et al.*, Monoamine Oxidase B Total Distribution Volume in the Prefrontal Cortex of Major Depressive Disorder: An [<sup>11</sup>C]SL25.1188 Positron Emission Tomography Study. *JAMA Psychiatry*. 2019;76(6):634–641.  
doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.0044
- Neurodegenerative\_disease (2025, May 24). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved May 26, 2025, from [https://en.wikipedia.org/wiki/Neurodegenerative\\_disease](https://en.wikipedia.org/wiki/Neurodegenerative_disease)
- Nonaka, T., Suzuki, G., Tanaka, Y., Kametani, F., Hirai, S., Okado, H., Miyashita, T., Saitoe, M., Akiyama, H., Masai, H., & Hasegawa, M. (2016). Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *The Journal of biological chemistry*, 291(11), 5473–5483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695379>
- Oiwa, K., Watanabe, S., Onodera, K., Iguchi, Y., Kinoshita, Y., Komine, O., Sobue, A., Okada, Y., Katsuno, M., & Yamanaka, K. (2023). Monomerization of TDP-43 is a key determinant for inducing TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science advances*, 9(31), eadf6895. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf6895>
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.-T., Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends. World Alzheimer's Report.
- Quiroz, Y. T., Sperling, R. A., Norton, D. J., Baena, A., Arboleda-Velasquez, J. F., Cosio, D., Schultz, A., Lapoint, M., Guzman-Velez, E., Miller, J. B., Kim, L. A., Chen, K., Tariot, P. N., Lopera, F., Reiman, E. M., & Johnson, K. A. (2018). Association Between Amyloid and Tau Accumulation in Young Adults With Autosomal Dominant Alzheimer Disease. *JAMA neurology*, 75(5), 548–556.

<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4907>

Rodenas-Cuadrado, P., Ho, J. & Vernes, S. Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders. *Eur J Hum Genet* 22, 171–178 (2014).

<https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.100>

Shih, YH., Tu, LH., Chang, TY. *et al.*, TDP-43 interacts with amyloid- $\beta$ , inhibits fibrillization, and worsens pathology in a model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 11, 5950 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19786-7>

Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R., & Post, R. M. (1995). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 1), 1768–1777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-01768.1995>

Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2022). Key substance use and mental health indicators in the United States: Results from the 2021 National Survey on Drug Use and Health (HHS Publication No. PEP22-07-01-005, NSDUH Series H-57). Rockville, MD: Center for Behavioral Health Statistics and Quality, Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Retrieved from <https://www.samhsa.gov/data/report/2021-nsduh-annual-national-report>

Tavares, I. A., Touma, D., Lynham, S., Troakes, C., Schober, M., Causevic, M., Garg, R., Noble, W., Killick, R., Bodi, I., Hanger, D. P., & Morris, J. D. (2013). Prostate-derived sterile 20-like kinases (PSKs/TAOKs) phosphorylate tau protein and are activated in tangle-bearing neurons in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 288(21), 15418–15429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448183>

Timm, T., Li, X. Y., Biernat, J., Jiao, J., Mandelkow, E., Vandekerckhove, J., & Mandelkow, E. M. (2003). MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *The EMBO journal*, 22(19), 5090–5101. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg447>

Valassina, N., Brusco, S., Salamone, A., Serra, L., Luoni, M., Giannelli, S., Bido, S., Massimino, L., Ungaro, F., Mazzara, P. G., D'Adamo, P., Lignani, G., Broccoli, V., & Colasante, G. (2022). *Scn1a* gene reactivation after symptom onset rescues pathological phenotypes in a mouse model of Dravet syndrome. *Nature communications*, 13(1), 161. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27837-w>

van Woerden, G. M., Bos, M., de Konink, C., Distel, B., Avagliano Trezza, R., Shur, N. E., Barañano, K., Mahida, S., Chassevent, A., Schreiber, A., Erwin, A. L., Gripp, K. W., Rehman, F., Brulleman, S., McCormack, R., de Geus, G., Kalsner, L., Sorlin, A.,

- Bruel, A. L., Koolen, D. A., ... Kleefstra, T. (2021). TAOK1 is associated with neurodevelopmental disorder and essential for neuronal maturation and cortical development. *Human mutation*, 42(4), 445–459. <https://doi.org/10.1002/humu.24176>
- Wakabayashi, K., Nagai, A., Sheikh, A. M., Shiota, Y., Narantuya, D., Watanabe, T., Masuda, J., Kobayashi, S., Kim, S. U., & Yamaguchi, S. (2010). Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *Journal of neuroscience research*, 88(5), 1017–1025. <https://doi.org/10.1002/jnr.22279>
- Wang, J., Li, W., Li, Z., Xue, Z., Zhang, Y., Yuan, Y., Shi, Y., Shan, S., Han, W., Li, F., & Qiu, Z. (2023). Taok1 haploinsufficiency leads to autistic-like behaviors in mice via the dorsal raphe nucleus. *Cell reports*, 42(9), 113078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113078>
- Woerman, A. L., Watts, J. C., Aoyagi, A., Giles, K., Middleton, L. T., & Prusiner, S. B. (2018).  $\alpha$ -Synuclein: Multiple System Atrophy Prions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(7), a024588. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024588>
- Zhou, J., Wu, C., & Zhao, M. (2024). TAOK1-mediated regulation of the YAP/TEAD pathway as a potential therapeutic target in heart failure. *PloS one*, 19(8), e0308619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308619>

## 【評語】 052007

本作品《神經與精神疾病的樞紐 TAOK1 對神經系統相關基因表現的效應》，以人類神經母細胞瘤細胞株 SH-SY5Y 為體外模型，利用 Tet-On 誘導系統過度表現 TAOK1，探討 TAOK1 過量表現對神經細胞形態與多種神經疾病及精神疾病相關基因表現的影響。主要結論發現：TAOK1 過度表現會導致分化中神經細胞軸突縮短，並減少  $\alpha / \beta$ -tubulin 蛋白質表現，同時顯著上調 BDNF、MAO-A、MAO-B 等精神疾病相關基因，且提升 TDP-43 及其磷酸化修飾(pTDP-43、神經退化重要標誌)的表現，突顯 TAOK1 作為神經退化與心理疾病連結分子的重要地位，未來有機會成為診斷與治療靶點。

1. 針對 AD 及 PD 等神經退化、心理疾病（如憂鬱、自閉）等跨領域疾病核心分子 TAOK1，結合分子生物、細胞學與臨床應用方向，具臨床應用潛力。
2. 利用可誘導表現系統進行基因調控，多重細胞株 clone 篩選、分化及未分化狀態比對，蛋白質層面(免疫染色/WB)、RNA 層面(RT-qPCR)及功能型(細胞形態/軸突長度)多層次驗證，數據呈現完整。

3. 本研究的結論主要基於體外細胞實驗（細胞軸突型態與蛋白質表現的觀察）。細胞實驗結果能否完全延伸解釋複雜的活體（in vivo）環境和人體，仍需更進一步的研究驗證。
4. 神經與精神疾病涉及極為複雜的基因網絡和多重因素的交互作用。本研究雖然突出了 TAOK1 的重要性，並解釋了部分的分子機制（如軸突縮短和特定蛋白質表現的變化），但 TAOK1 如何精確調控這些基因，以及其上下游的信號通路如何參與神經和精神疾病的發生發展，以及與其他關鍵基因的相互關係，仍需更深入的研究來完善，以及更多討論。

作品海報



神經與精神疾病的樞紐

**TAOK1**對神經系統相關基因表現的效應



壹、研究動機與目的

- 過去發現阿茲海默症和伴隨認知障礙的帕金森氏症患者體內，**TAOK1 (絲胺酸/蘇胺酸激酶)** 的表現異常增高，可作為一種生物標記
- TAOK1 的異常：可能導致細胞死亡和**病理性 tau 蛋白磷酸化**等問題，亦與自閉症等神經心理疾病的行為有關
- 本研究旨在探討 TAOK1 過度表現對神經細胞及相關基因的影響，特別是與阿茲海默症、失智症、憂鬱症和自閉症等疾病相關的蛋白基因
- 期望能了解 TAOK1 在神經系統疾病中的樞紐作用，為未來開發新的治療策略提供基礎

貳、實驗設計

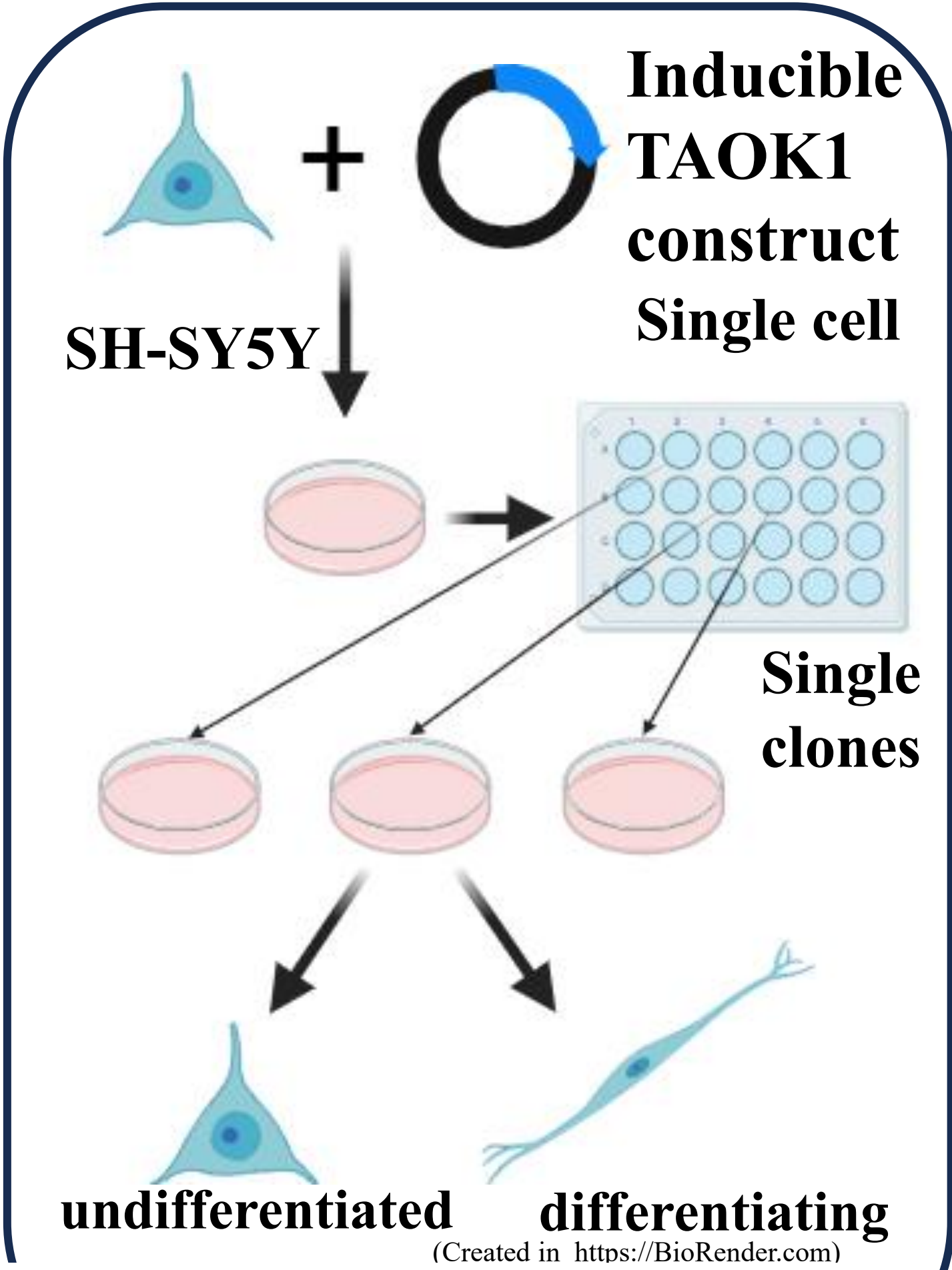


圖1 以 Tet-On system 調控 TAOK1 表現，並篩選出單細胞株

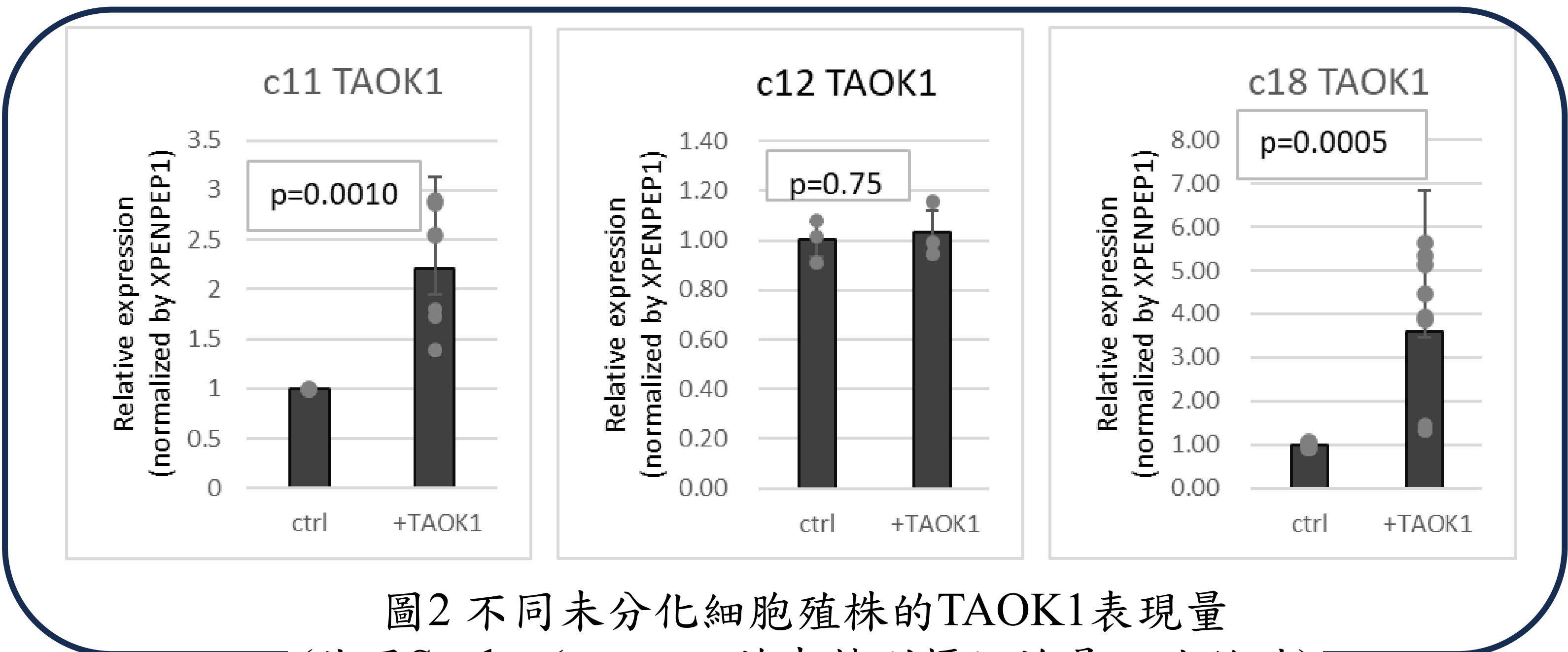


圖2 不同未分化細胞植株的TAOK1表現量 (使用 Student's t-test ; 若未特別標註均是以此統計)

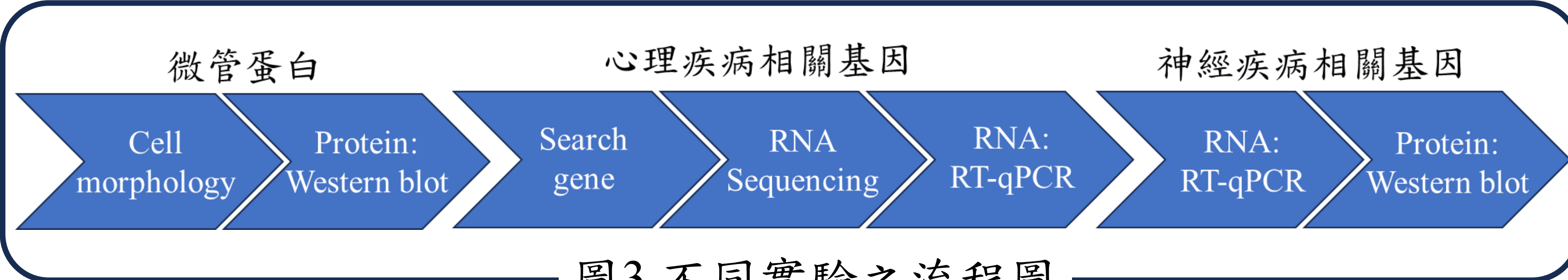


圖3 不同實驗之流程圖

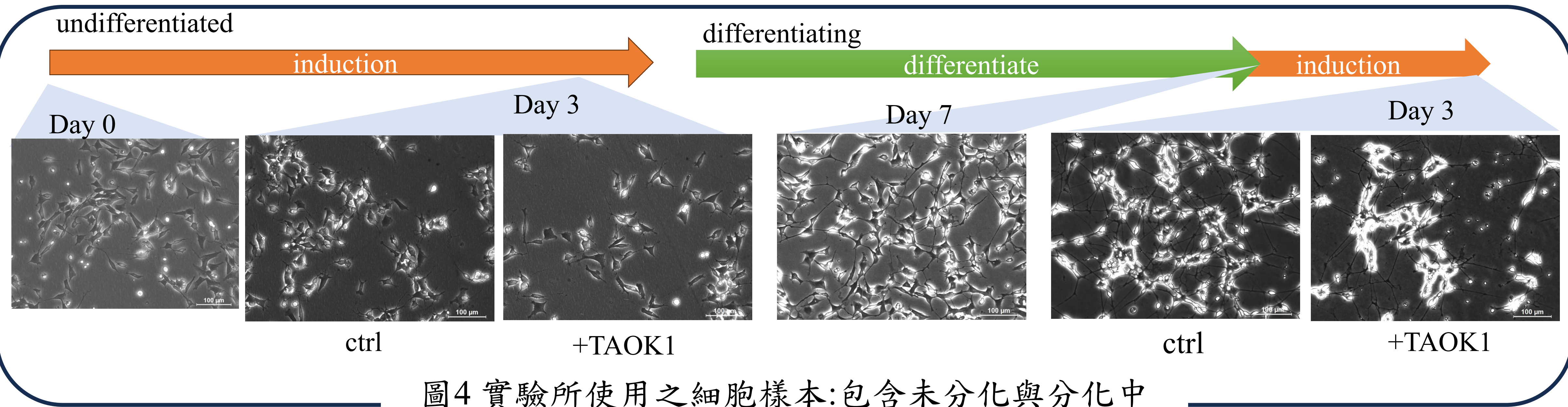


圖4 實驗所使用之細胞樣本:包含未分化與分化中

參、研究結果及討論

一、細胞神經突型態

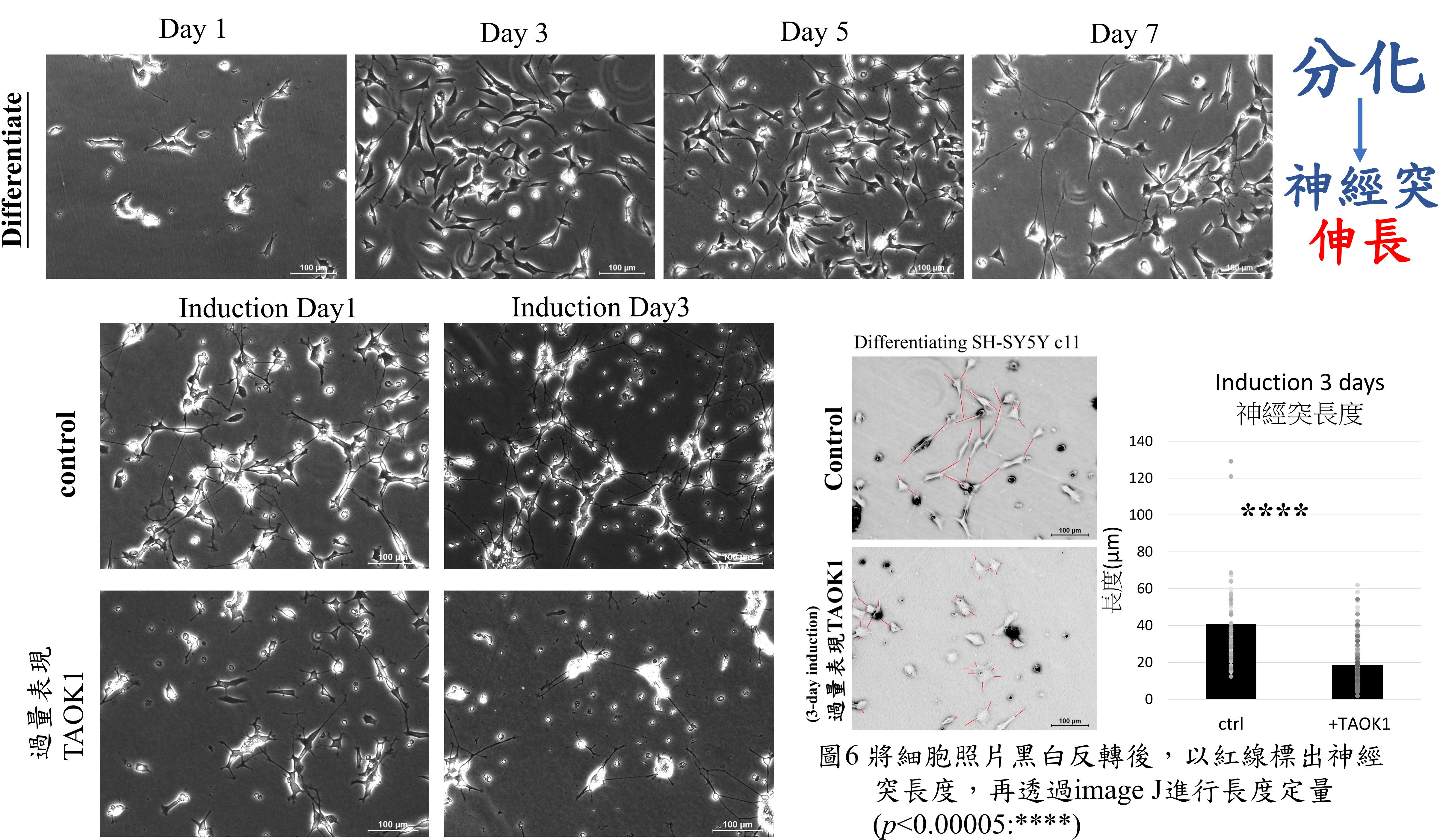


圖5 將細胞進行分化後，增加TAOK1表現

- SH-SY5Y之神經突隨分化延長
- TAOK1過度表現後，神經突會顯著縮短

TAOK1 ↑ → 神經突 縮短



二、TAOK1的過度表現對微管蛋白表現之影響

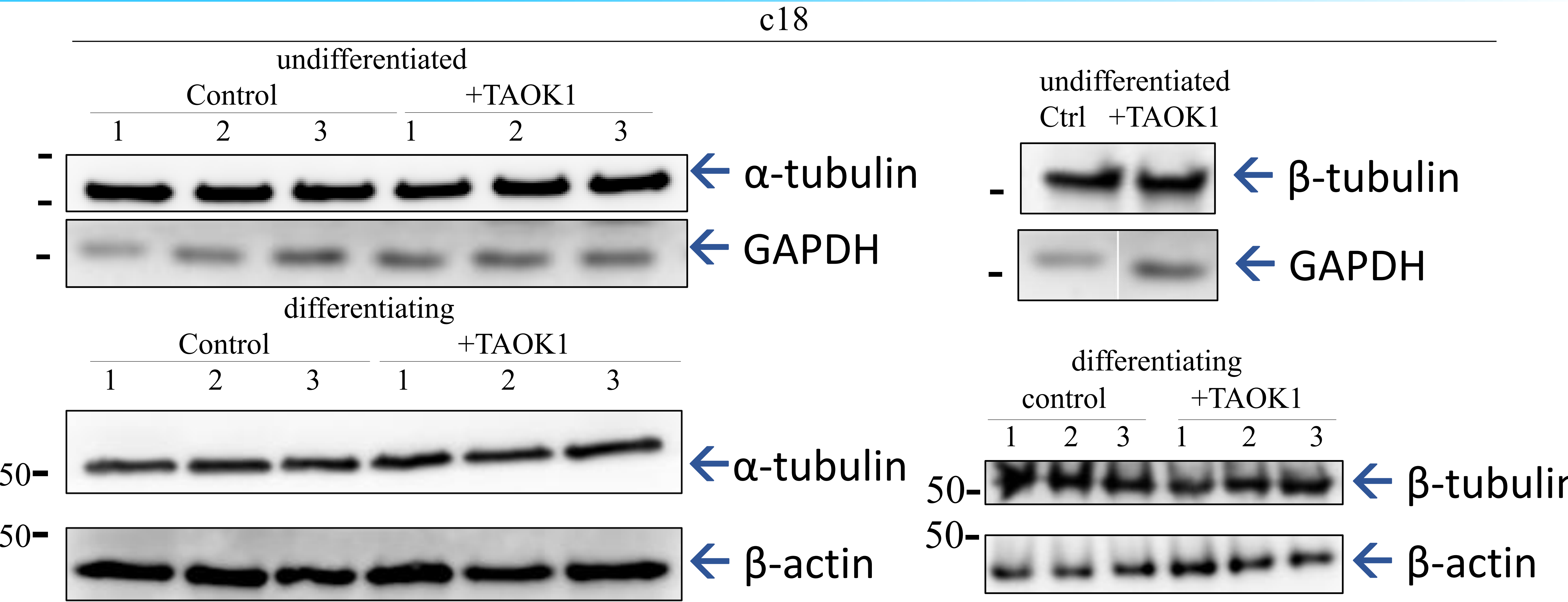


圖7 透過Western blot分析未分化、分化中的細胞之α-tubulin及β-tubulin表現

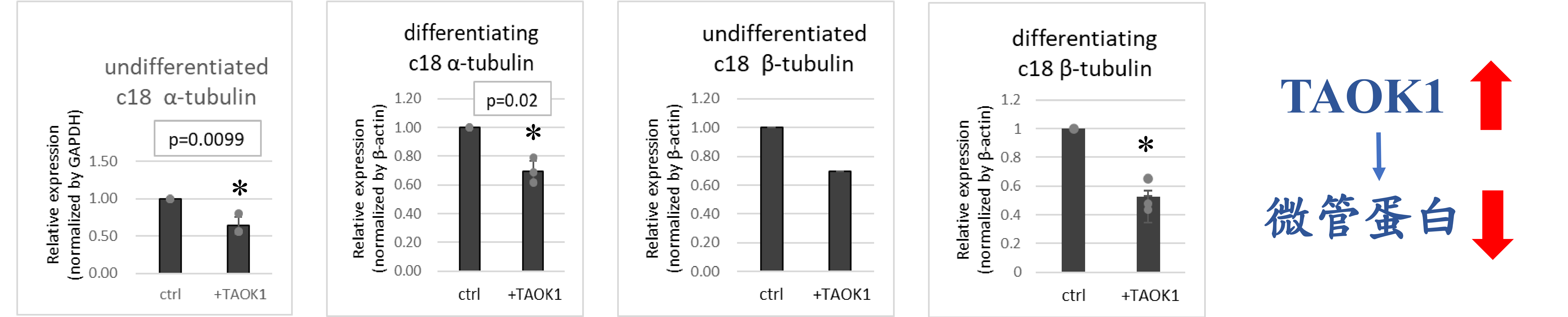


圖8 透過image J 以GAPDH與β-actin為內源基因定量分析α-tubulin與β-tubulin表現

- α-tubulin 與 β-tubulin 在 TAOK1 過量表現時都顯著下降
- α-tubulin 與 β-tubulin 為微管主要組成蛋白→推測微管蛋白表現的減少是導致神經圖縮短的可能原因

三、對神經退化性疾病相關基因—TDP-43的影響

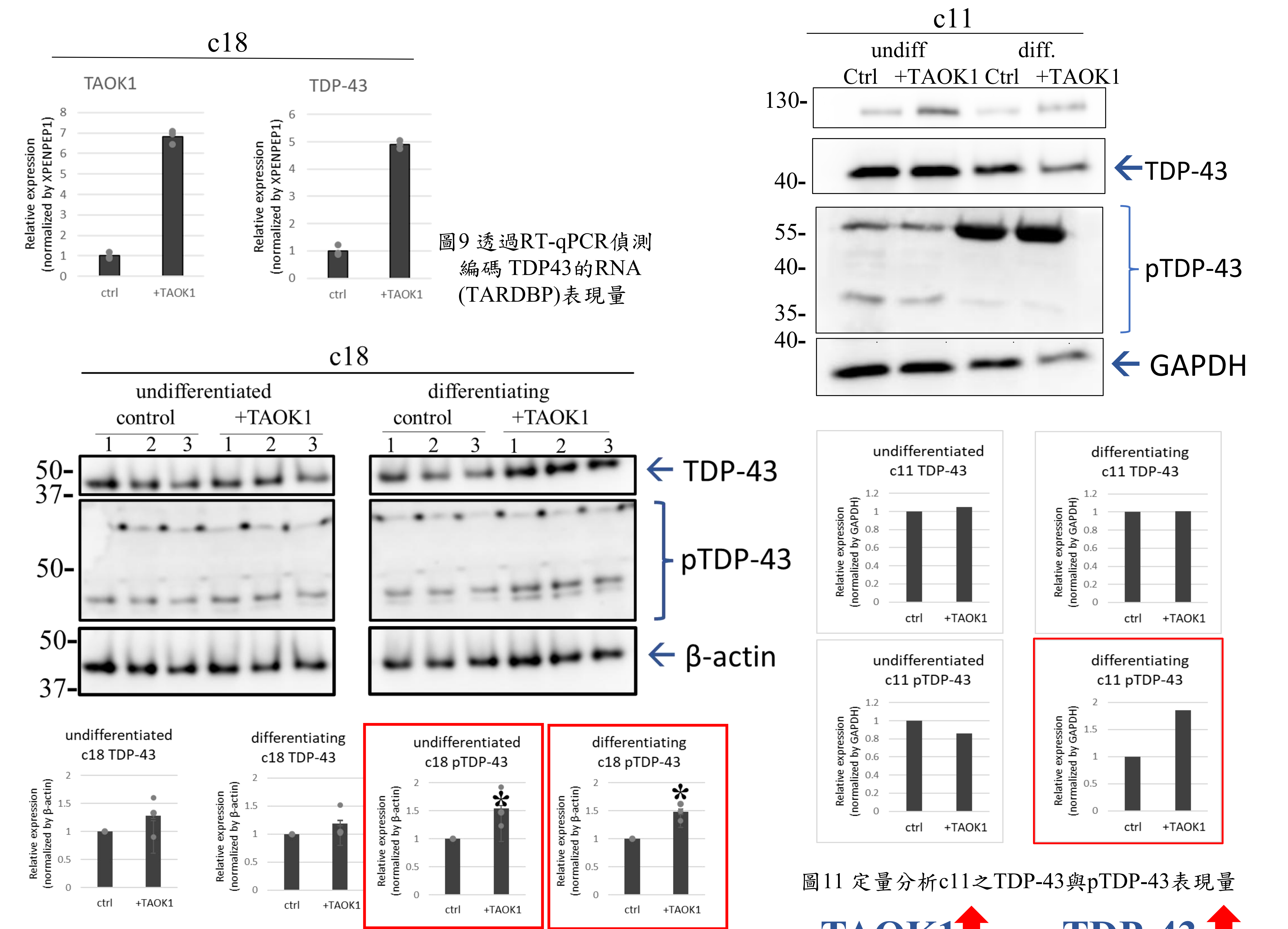
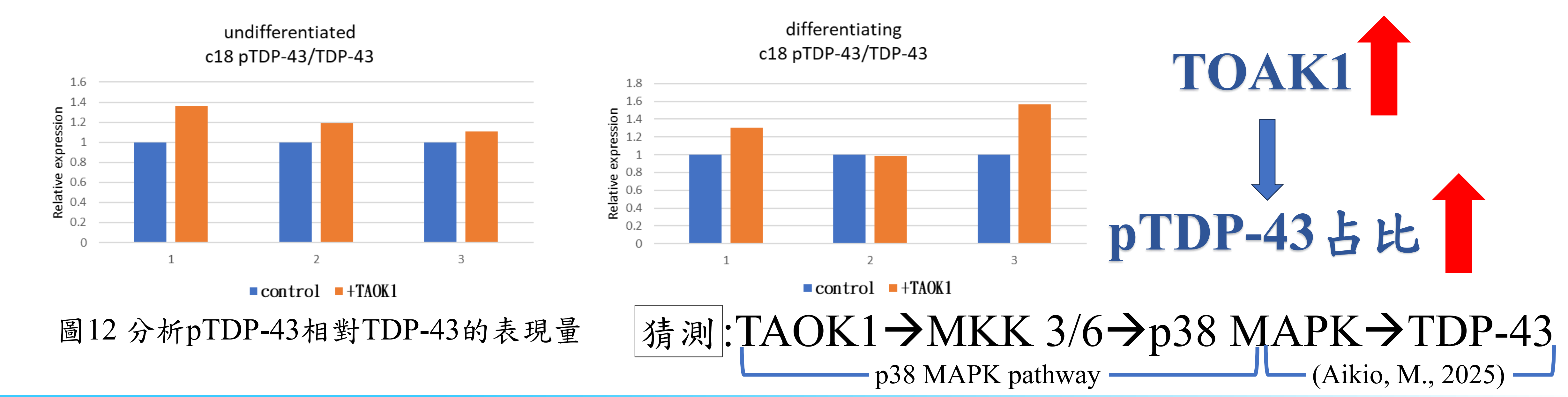


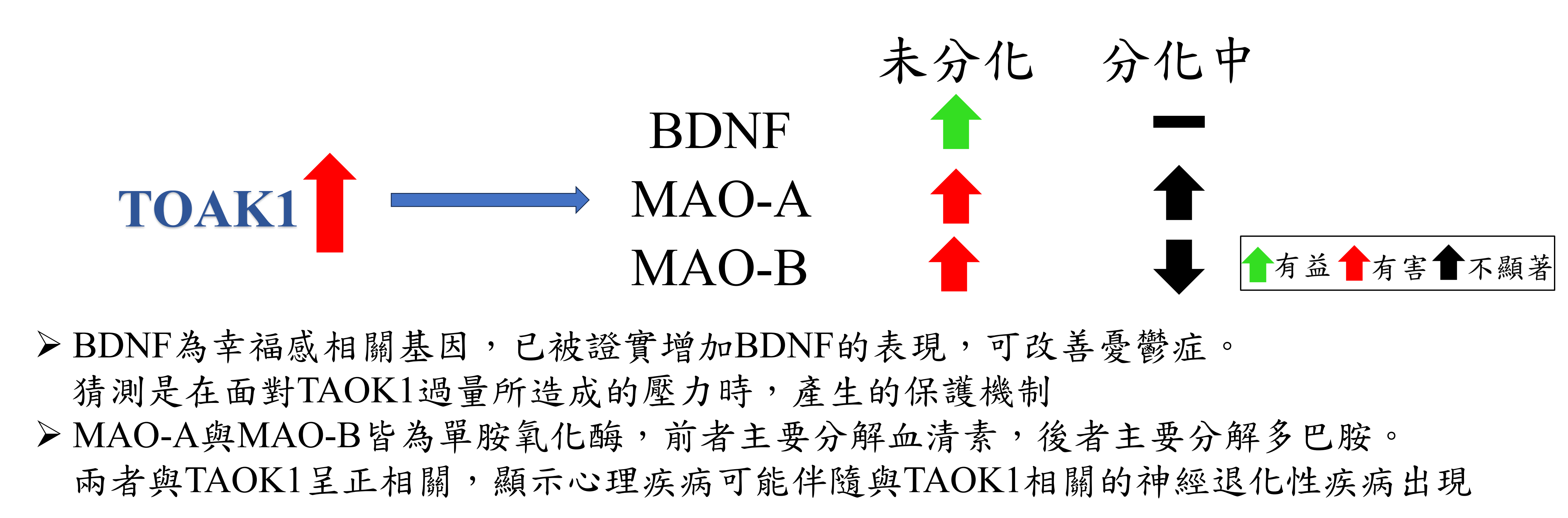
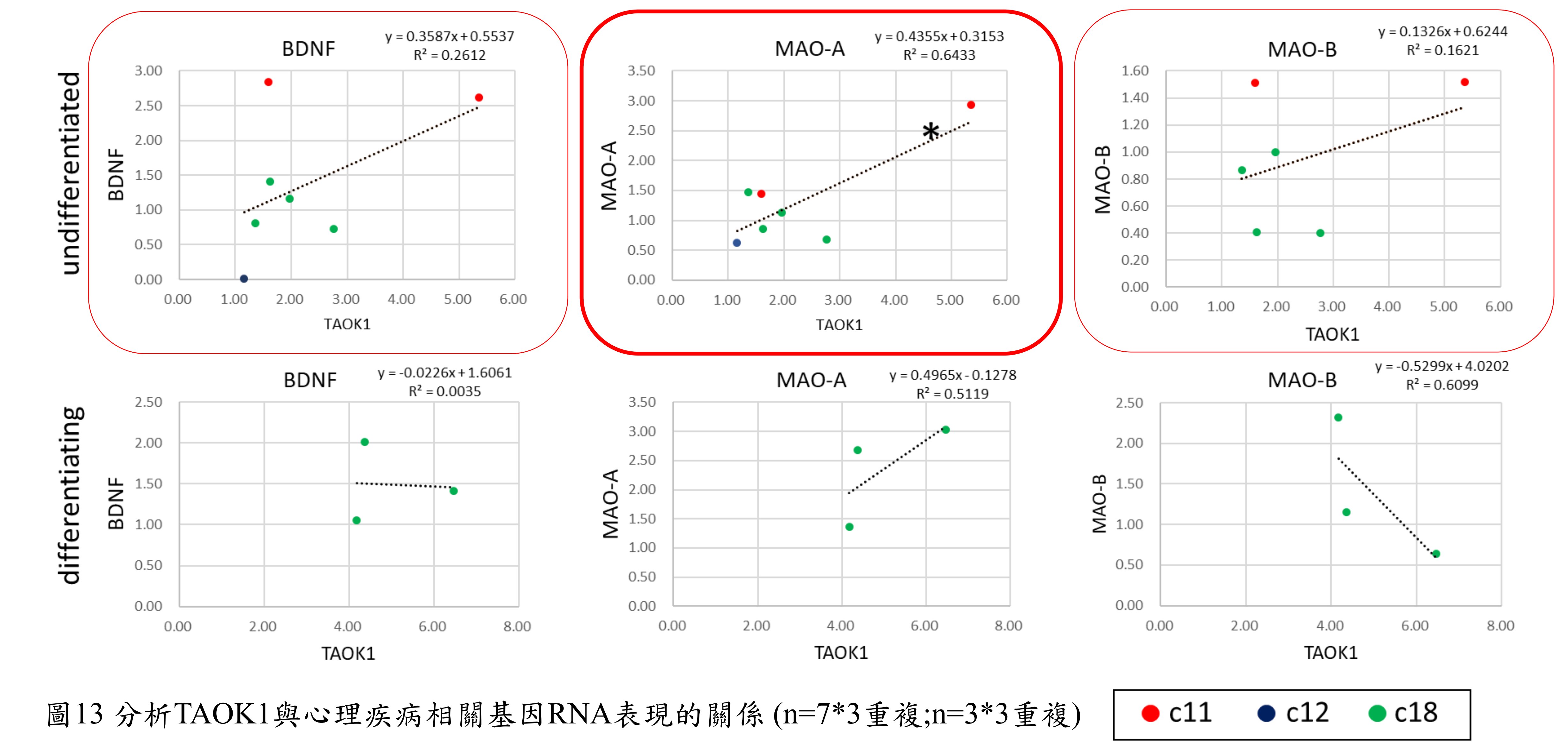
圖10 定量分析c18之TDP-43與pTDP-43表現量

圖11 定量分析c11之TDP-43與pTDP-43表現量

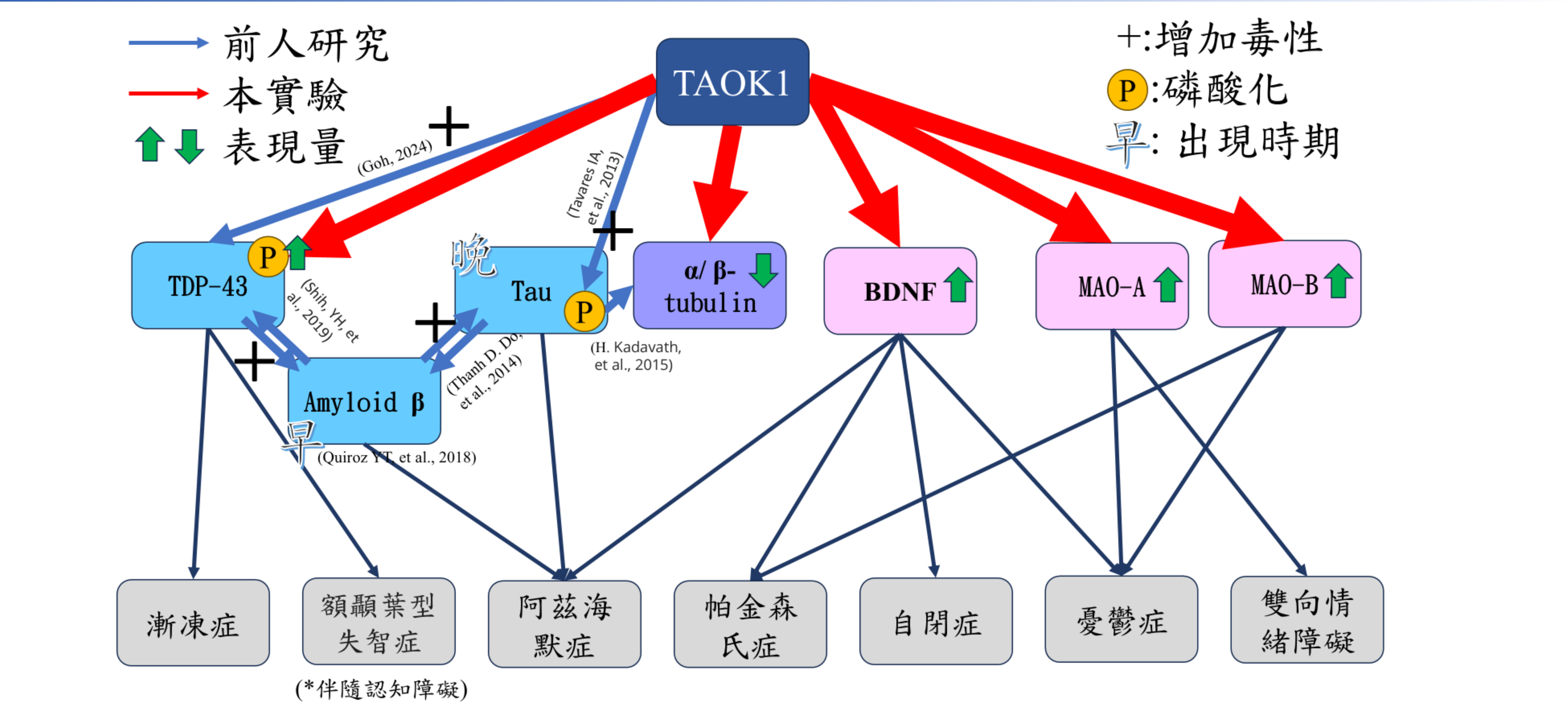




#### 四、TAOK1過量表現對心理疾病相關基因表現之影響



#### 肆、結論



#### 伍、參考文獻

Aikio, M., Odeh, H. M., Wobst, H. J., Lee, B. L., Chan, Ú., Mauna, J. C., Mack, K. L., Class, B., Ollerhead, T. A., Ford, A. F., Barbieri, E. M., Cupo, R. R., Drake, L. E., Smalley, J. L., Lin, Y. T., Lam, S., Thomas, R., Castello, N., Baral, A., Beyer, J. N., ... Shorter, J. (2025). Opposing roles of p38α-mediated phosphorylation and PRMT1-mediated arginine methylation in driving TDP-43 proteinopathy. *Cell reports*, 44(1), 115205.<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115205>

Goh, J. M. (2024). 探討 TAOK1 在 SH-SY5Y神經母細胞中的神經毒性及神經炎症效應 [master's thesis, National Taiwan University]. Airiti Library. <https://doi.org/10.6342/NTU202402516>

Kung, P. J., Tsai, Y. T., Yu, R. L., Kuo, M. C., Wu, C. C., Hong, C. T., Ueda, K., Lin, S. P. and Wu, R. M. (in preparation). Elevated Levels of Extracellular Vesicle-Associated TAOK1 in Plasma: A Diagnostic Marker for Cognitive Decline in Parkinson's Disease Dementia and Alzheimer's Disease. *Sugmi. Movement Disorder*. Manuscript submitted for publication.