

# 2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090018  
參展科別 醫學與健康科學  
作品名稱 以線蟲動物模式評估漸凍人症之運動障礙  
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 國立臺南第一高級中學  
指導教師 邱文泰、林靜吟  
作者姓名 陳俊鴻、黃鈞邨、黃亮鈞

關鍵字 漸凍人症、線蟲、BLMP-1

## 作者簡介



我是陳俊鴻（左），目前就讀台南一中二年級。拜擅長於跳躍性思考所賜，在這次的科展中突破了許多推導的瓶頸，並且從中習得許多思想與知識。

我是黃鈞邨（右），是組長同學。由於從小對動手實作就有莫大的熱情，因此學習操作時較他人易於上手，而科展不僅讓我一展長才也學了許多知識。

我是黃亮鈞（中），是組長同學。雖然我是中途加入，但在組長的解釋與討論後，我很快便進入狀況，並且也在討論中提出自己的見解。

## 摘要

本研究探討 TDP-43 突變之漸凍人症(ALS)線蟲模式中的 BLMP-1 與其運動障礙之間的關係。在 ALS 患者的運動神經元內，Fas 訊息途徑活化之 ASK1 激酶被證實會導致軸突運輸障礙。在長壽漿細胞中，有研究發現 BLIMP1 可調控 ASK1 之表現。因此，本研究推測在 TDP-43 突變線蟲運動神經元中，BLMP-1(人類 BLIMP1 之同源蛋白質)會降低 NSY-1(人類 ASK1 之同源蛋白質)表現，間接證明提升 BLMP-1 量有助改善癱瘓症狀。

本研究藉降低 NSY-1 表現的方式，分析線蟲之癱瘓程度與運動動能驗證 Fas 訊息途徑在線蟲中亦對運動功能障礙有顯著促進，確認其作為本研究模式生物之合理性。此外，將其側腹神經索中的 BLMP-1 表現量下降，發現其運動功能急遽惡化。最後將兩基因之表現量下降，則運動功能改善。

本研究首度證實線蟲之 BLMP-1 能有效的阻礙 NSY-1 所造成之運動障礙，且降低 BLMP-1 表達量會加劇其癱瘓症狀。此研究之發現對 *SOD1* 突變引起的 ALS 治療提供一個新研究方向及治癒的可能性。

## Abstract

This study aims to focus on the relationship between B lymphocyte induced-maturation protein (BLMP-1) and dyskinesia in the TDP-43 mutant *C. elegans* which as an animal model for human amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Activation of apoptosis signal regulating kinase 1(ASK1) by the Fas signaling pathway has been proved to cause axonal transport disturbance in human ALS motor neurons. On the other hand, the repression of ASK1 involving BLIMP1 has been observed in long-lived plasma cells. Thus, we speculated that NSY-1 (the human ASK1 homologous protein) can be downregulated by BLMP-1(the human BLIMP1 homologous protein) in motor neurons of the TDP-43 mutant *C. elegans*, which can prove the increase of BLMP-1 improves the symptoms of paralysis.

In order to verify the rationality of using *C. elegans* as the ALS animal model of this study, knocking down the expression levels of NSY-1 and/or BLMP-1 through means such as RNAi were used in this study. We found that knockdown of NSY-1 by siRNA improved Fas-mediated dyskinesia of *C. elegans* by analyzing its kinetic power and paralysis. In addition, knockdown of BLMP-1 in the ventral nerve cord of *C. elegans* had deteriorated sharply of their motor function. Furthermore, knockdown of both NSY-1 and BLMP-1 carried improvement of motor function in *C. elegans*.

In conclusion, our study confirmed BLMP-1 downregulated NSY-1-mediated dyskinesia efficiently, whereas knockdown of BLMP-1 accelerated paralysis in the TDP-43 mutant *C. elegans*. The findings of this study provide a new research direction and therapeutic possibility of ALS caused by *SOD1* mutation.

## 壹、前言

2014 年發起的冰桶挑戰使得肌萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)引起全球關注。ALS 也稱為漸凍人症，其發生率不低，但普及率卻相當低，這是因為患者發病後存活時間過短所致[1]。漸凍人症除了存活時間為一大威脅外，患者逐漸無法控制隨意肌也是一大威脅。因此，探討如何減緩此病症使患者生活品質更加提升是一個重要的研究方向。

漸凍人症是一種神經退化性疾病(neurodegeneration)，也是最常見的運動神經元疾病(motor neuron diseases)，發病過程為中樞神經系統控制骨骼肌之運動神經元漸進性退化，導致肌肉逐漸萎縮無力，最終患者喪失控制隨意肌之運動能力，但 ALS 並不影響高級神經活動，因此患者直到晚期仍保持清晰的思考與記憶，而目前最有效的療法主要以利魯唑(Riluzole tablets)治療，但僅能為患者延長二至三個月的壽命。

ALS 可分為遺傳性及偶發性兩類，遺傳性中以超氧化歧化酶-1 基因(superoxide dismutase 1 gene, *SOD1*, 在本文用斜體表示基因)突變最為常見，也因此常被作為研究 ALS 的對象。超氧化歧化酶-1(superoxide dismutase 1, SOD1, 正體表示酶-蛋白質)為細胞內一種酵素，能降低活性氧化因子(reactive oxygen species, ROS)對細胞造成氧化壓力，其過程為催化細胞內所產生的超氧化物(superoxide)與兩個氫離子行自身氧化還原，轉化成氧氣和過氧化氫(圖 1)，而產生的過氧化氫再由過氧化體中的觸酶分解成氧氣和水[2]。

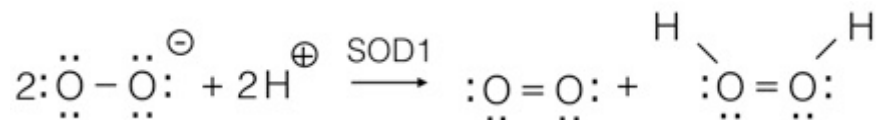


圖 1 SOD1 降低超氧化物對細胞之氧化壓力

在 SOD1 上有與銅離子和鋅離子結合的活化位(active site)，然而當 *SOD1* 在一般細胞突變而轉譯產出的 SOD1 突變蛋白，其活化位就會缺乏與鋅離子結合的能力，導致 SOD1 突變蛋白喪失部分功能而無法催化某些超氧化物代謝，有時還會逆轉反應程序而催化過

氧化氫和氧氣產生超氧化物和氫離子，如此一來，細胞內便開始累積超氧化物而造成 ROS 的增加，對細胞產生氧化壓力而破壞蛋白質、脂質及 DNA 等。

根據 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)所繪製 *SOD1* 突變體的運動神經元細胞訊息途徑中[3][4](圖 2)，可以發現圖中最下面的訊息途徑將會造成軸突(axon)運輸動力降低，這乃是由於錯誤折疊的 *SOD1* 突變蛋白觸發小膠質細胞(microglia)對神經元細胞釋出毒性因子(toxic factors)，其中一氧化氮進入運動神經元並和先前細胞累積的超氧化物作用，產生亦屬於 ROS 的過氧化亞硝酸鹽進而對細胞造成氧化壓力。此外，寡突膠細胞(oligodendrocyte)還會釋出 TNF- $\alpha$ (腫瘤壞死因子, tumor necrosis factor- $\alpha$ )與細胞膜上的 TNF 接受器(TNF-receptor)結合後，進而協同 Fas 配體(Fas ligand, FasL, Fas 是一種訊息途徑)引發一連串 MAPK 相關之訊息途徑反應(mitogen activated protein kinase signaling 訊息途徑)，最終活化細胞凋亡的訊息途徑。

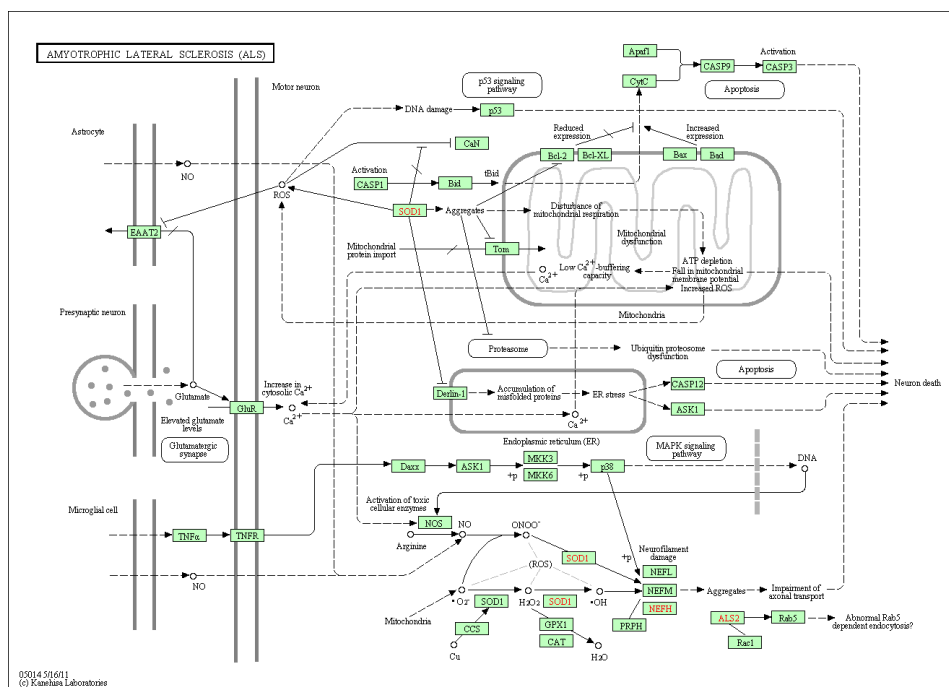


圖 2 KEGG 的 ALS(*SOD1* 突變)運動神經元細胞內訊息途徑圖[3][4]

而發生在患者神經軸突的訊息途徑中(圖 3)，圖中顯示 *SOD1* 突變與谷氨酸(glutamate)活化 p38 有關，p38 除了磷酸化微管上的 kinesin 和 dynein-dynactin 馬達蛋白，而使粒線體

無法被馬達蛋白運送至突觸之外，也同時與 CDK5-p25K 磷酸化神經絲(neurofilament, NF)，促使其無法與另兩種 retrograde 和 anterograde 馬達蛋白的活化位結合，由於神經絲主要功能為支撐及調節軸突的直徑大小，因此也造成軸突管徑萎縮，進而造成粒線體與其他物質運輸更加困難。而谷氨酸所活化的 JNK (c-Jun 氨基末端激酶,c-Jun N-terminal kinase) 也會磷酸化馬達蛋白與微管結合的活化位，使馬達蛋白也喪失功能而無法運作，造成軸突運輸 cargo 減少，導致神經元傳訊困難而無法控制隨意肌，最終突觸及軸突也都萎縮(軸突和突觸失去 ATP 來源) [5]。因此，若能阻擋圖 3 中的有害訊息途徑，則將使粒線體可運輸至突觸，也使神經絲可與微管上的馬達蛋白結合，以維持軸突的形狀，可預期地大大改善突觸 ATP 量減少、軸突萎縮及訊息傳遞困難的問題，使患者較可控制隨意肌，而使生活更加便利。

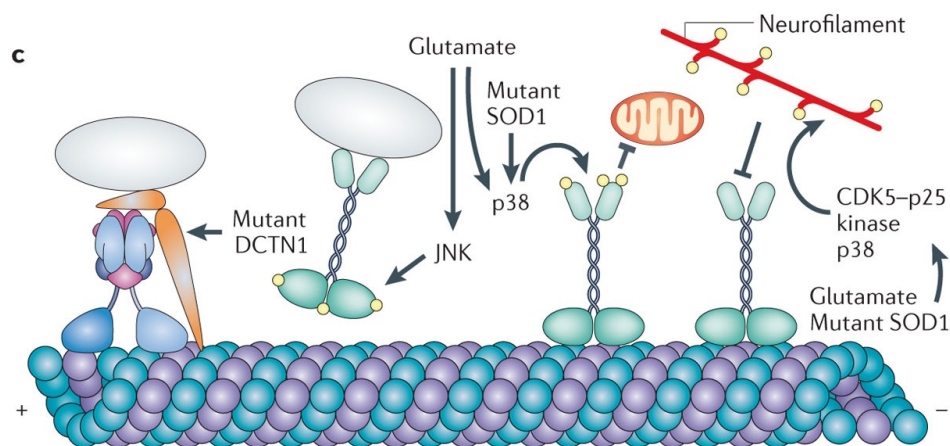


圖 3 *SOD1* 突變對軸突之影響及訊息途徑[5]

*SOD1* 突變之運動神經元對 Fas 訊息途徑是相當敏感的，因此 Fas 訊息途徑在造成病症方面是具有相當影響力，而 Fas 訊息途徑活化乃自 Daxx-ASK1-p38 路徑(圖 4)，故以 p38 inhibitor SB203580 阻擋此路徑，效果相當顯著[6]。雖然 p38 對軸突的破壞是顯著的，但其抑制物無法直接治療患者，並且也可能對其他組織造成毒性，因此本研究將試圖以其他方式阻擋 Fas 訊息途徑為主要目標。

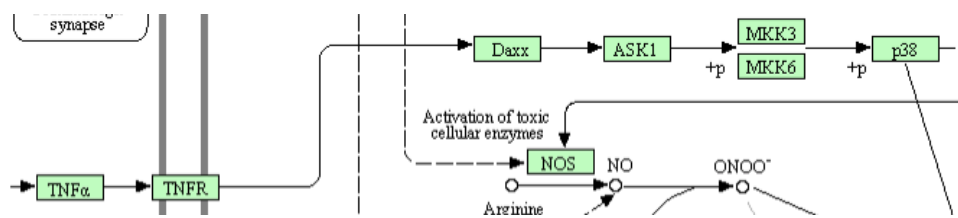


圖 4 Fas 訊息途徑[3][4]

由圖 4 可得知 ASK1(Apoptosis signal-regulating kinase 1)為磷酸化作用的起頭，因此未經大量訊息放大，故其數量較少則較易於抑制其表現，故本研究以抑制 ASK1 表現作為阻擋 Fas 訊息途徑之方法。而 ASK1 在短壽命漿細胞中是造成細胞凋亡的主因，長壽命漿細胞與短壽命漿細胞不同之處在於長壽命漿細胞以鋅指轉錄因子蛋白 PRDM1(PR Domain Zinc Finger Protein 1)/Blimp-1(B lymphocyte- induced maturation protein 1)以降低 ASK1 表現量來阻止誘發細胞凋亡，進而延長漿細胞之壽命[7]。若將長壽命漿細胞 PRDM1 數量減少時，漿細胞便很快地進行細胞凋亡，可見 ASK1 產生其下游的速度相當大量且快速，也可以發現 Blimp-1 在長壽命漿細胞中相當有效率地調控 ASK1。而 ASK1 在短壽命漿細胞中會磷酸化 p38 及 JNK，而 ASK1 也在 *SOD1* 突變的運動神經元中磷酸化 p38 及 JNK(圖 5)。因此，本研究推測在 *SOD1* 突變的運動神經元中，以 PRDM1 降低 ASK1 表現量而減少 ASK1-p38 訊息途徑，將很可能有顯著抑制運動神經元凋亡及軸突訊息傳遞困難的效果。

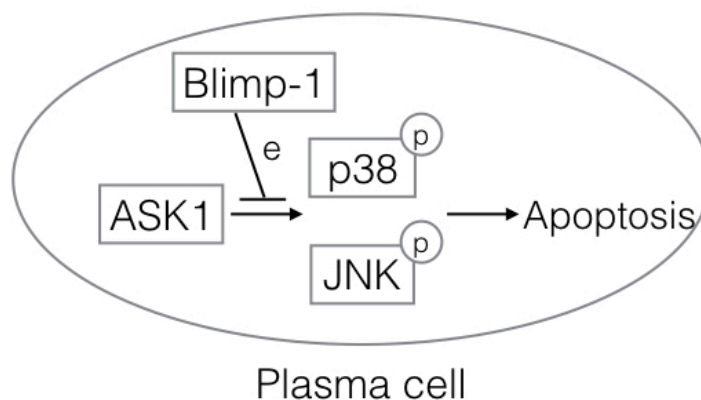


圖 5 Blimp-1 在漿細胞中調控 ASK1 磷酸化 p38 及 JNK



在許多動物模式中，TDP-43 突變線蟲(ALS 之線蟲動物模式)已被發現其運動神經元內 NSY-1-PMK-1 訊息途徑(與 ASK1-p38 訊息途徑為同源關係)造成蛋白質聚集、突觸粒線體減少、Cargo 無法運輸[8]，並且在線蟲之腹測神經索神經元中被發現會自我生產 BLMP-1(PRDM1/Blimp-1 的同源蛋白質)[9]。因此，雖然線蟲與人類差距過大，但對於 ASK1-p38 訊息途徑在運動神經元中的表現卻極為相似，且以線蟲為動物模式可以 RNAi 操縱目標蛋白質之表現量，故本研究將針對 BLMP-1 與 NSY-1-PMK-1 訊息途徑之間的關係以 RNAi 證明。

## 貳、研究方法

### 一、研究目標及流程

- (一) 阻擋 TDP-43 突變線蟲的 Fas 訊息途徑是否有助於延緩病情(NSY-1 KD)
- (二) 降低 TDP-43 突變線蟲 BLMP-1 的表現是否惡化病情(BLMP-1 KD)
- (三) 確認 BLMP-1 降低 NSY-1 表現量為真 (NSY-1, BLMP-1 KD)

若 TDP-43 突變線蟲的 Fas 訊息途徑在運動神經內也顯著的影響癱瘓，則將其 NSY-1 KD 後，預期將使病症改善。而假設 BLMP-1 會降低 Fas 訊息途徑的表現，則將線蟲的 BLMP-1 KD 後，預期將使線蟲更癱瘓。並且將線蟲的 NSY-1 及 BLMP-1 KD 後，該線蟲之癱瘓將可能比 L4440 較為改善。

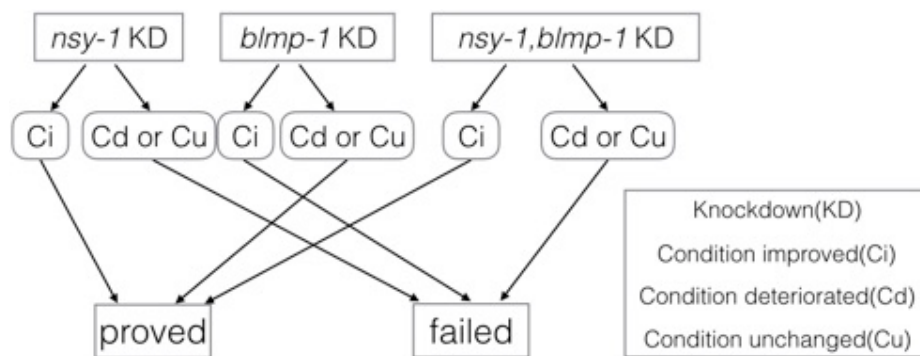


圖 6 研究目標

欲得到上述之目標，實驗設計流程將以兩種分析方式進行比較，如圖 9 的實驗設計，

而其中本研究之實驗組及對照組皆使用 CL6049 線蟲。本研究之線蟲分為四組，一組為

對照組 L4440，另外三組為實驗組 NSY-1 KD、BLMP-1 KD 及 NSY-1, BLMP-1 KD，實驗組皆從幼蟲期進行 RNAi。而在 L4 階段時，每組分為進行 paralysis assays 的兩盤線蟲(每組六十隻線蟲)，及  $\mu$ PIV system 攝影的五盤線蟲(每組約兩百隻)。由於癱瘓曲線未必能表現出個體之運動是否改善，故本研究也以  $\mu$ PIV system 進行觀測並分析。

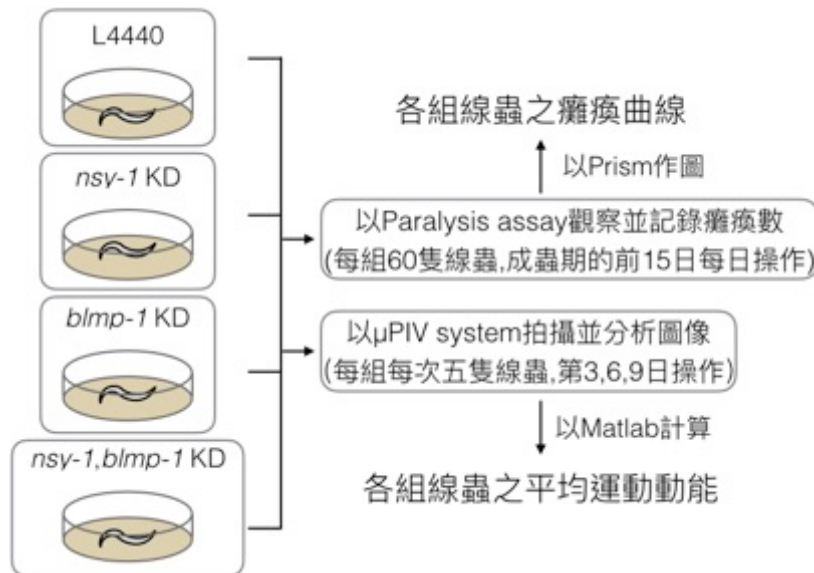


圖 7 分析方法

## 二、實驗材料及方法

### (一) 線蟲

本實驗採用線蟲株為 CL6049(購自 Caenorhabditis Genetics Center), CL6049 為 TDP-43 突變的線蟲，可作為 ALS 之 model，由於 CL6049 為溫度高低操控癱瘓表現大小，但也必須避免對照組線蟲熱休克影響觀察的真實性，因此本實驗將於 20°C 進行培養與處理線蟲。由於實驗組將以 RNAi 將基因 knockdown，因此實驗組及對照組的線蟲都被維持於有 HT115 大腸桿菌且加入 IPTG(isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, 乳糖操作子) 和抗生素 carbenicillin 的 NG-IC 培養基中。本實驗的觀察以線蟲的 L4 階段作為第零天，而在第零天後，每日以挑蟲器將觀察目標移至新的培養基，以避免卵及幼蟲生長為成蟲影響觀察與取樣。

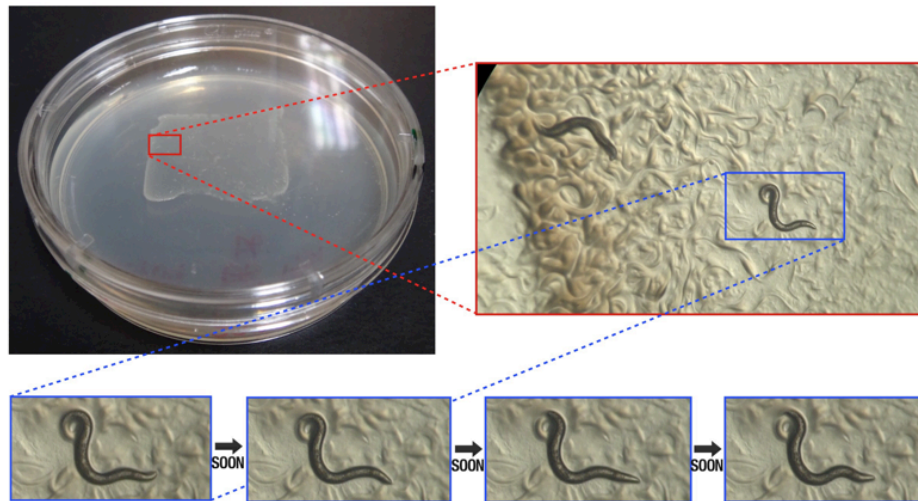


圖 8 培養皿及線蟲的運動

## (二) RNAi

RNA 干擾術(RNAi)是以一小段 RNA 來抑制生物體內基因表現的過程，其中線蟲的 RNAi 方法是以 siRNA(small interference RNA,小片段干擾核糖核酸)來造成基因沉默(gene silencing)。在大腸桿菌 HT115 體內的質體(plasmid)可藉由 DNA 限制酶將欲抑制的 RNA 片段所對應之 DNA 片段植入質體中，在線蟲消化吸收所攝取的 RNAi 大腸桿菌時，RNA 片段便會接到與之序列互補的 mRNA 片段上，進而阻擋 tRNA 與該 mRNA 的結合，或使 RNA 降解以達到抑制基因表現的效果。此外，由於 HT115 缺乏清除體內 RNA 片段的基因，因此不會將轉錄出的 RNA 分解掉，故不影響抑制效果。在本實驗中，以含有 *nsy-1* 和 BLMP-1 RNAi 的大腸桿菌餵養線蟲，以達到抑制核糖體製造 NSY-1 和 BLMP-1，並以只有空質體的 L4440 大腸桿菌作為對照組。

在植入 DNA 片段於質體 pL4440 時，會同時植入一段基因使 HT115 對於抗生素具有抗藥性，此機制可以篩選出已成功植入植體的大腸桿菌作為線蟲食源。本實驗使用抗生素 carbenicillin，而非一般篩選大腸桿菌的抗生素 ampicillin，用以降低其對線蟲的傷害。此外，在質體進入大腸桿菌後，T7 蛋白質並不會直接開始轉錄 T7 promoter 的基因，尚須人工乳糖操作子的參與。在無人工乳糖操作子的情況下，大腸桿菌體內會產生抑制 T7 promoter 基因轉錄的抑制子蛋白，使其無法正常產出 RNA，但在加入後，抑

制子蛋白會和 IPTG 結合，使 T7 蛋白質正常運作，產出實驗所需之雙股 RNA。而在線蟲消化大腸桿菌時，雙股 RNA 會表現出來，經由線蟲體內的酵素 Dicer 的作用而被切成小段的 siRNA，此 RNA 片段會隨機和線蟲體內對應之相同 mRNA 序列接合使其無反正常轉譯出蛋白質，或是再接合後使目標 mRNA 遭降解及清除，達到干擾目標 DNA 的表現。

### (三) Paralysis assays

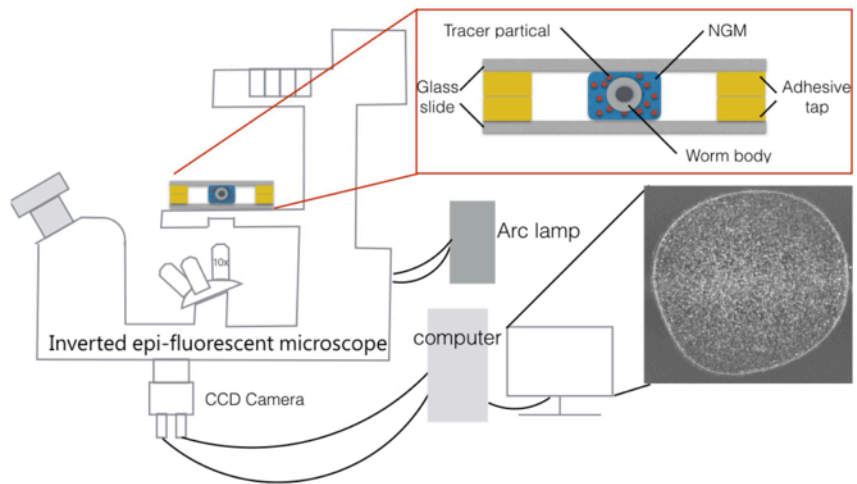
線蟲成蟲從第一天開始每日計算當日新增的癱瘓線蟲數目，並持續十五天(由於本研究之實驗設計預期有病情好轉及惡化的情況，且 CL6049 線蟲於第十五日達到 50% 的線蟲癱瘓)。判定線蟲是否癱瘓時，會以挑蟲器碰觸線蟲的頭部及尾部，若身體及尾部無運動則被判定為「癱瘓」並計入當天的癱瘓數，而癱瘓的線蟲會被移出培養基，以避免影響隔日的觀察，而每日計算剩餘線蟲數量時，若發現有線蟲消失，則計為「遺失」，最後再將每日癱瘓數累加並以軟體 Prism 繪成該次實驗的癱瘓曲線。

### (四) $\mu$ PIV system

$\mu$  PIV system 是用於測量線蟲在微小液滴中速度場的方法(圖 9)，用以估算線蟲的活力。本研究以倒立落射螢光顯微鏡(IX71, Olympus)作為觀測流體的平台，並透過在 190  $\mu$ l 的 NGM 緩衝液中混合 10  $\mu$ l 聚苯乙烯顆粒(dp=3.2  $\mu$  m, 540/610, Fisher Scientific)，製備膠體懸浮液，並將配置完成的液體 0.5  $\mu$ l 滴於載玻片上。將欲測量的線蟲移至液滴中，再將另一個載玻片覆蓋。而在兩片載玻片中，則以雙層膠帶重疊黏貼做出 110  $\mu$  m 的間隙(圖 10(a))，此大小恰為線蟲成蟲的平均腰徑，使線蟲可在玻片中游動。為了測量 0.5  $\mu$ l 液滴的整個圖像，使用 10 倍物鏡和對應於螢光顆粒的綠色濾鏡(U-MWIG3, excitation BP530-550, dichronic mirror DM570, emission BA575-UF, Olympus)(圖 10(b))。

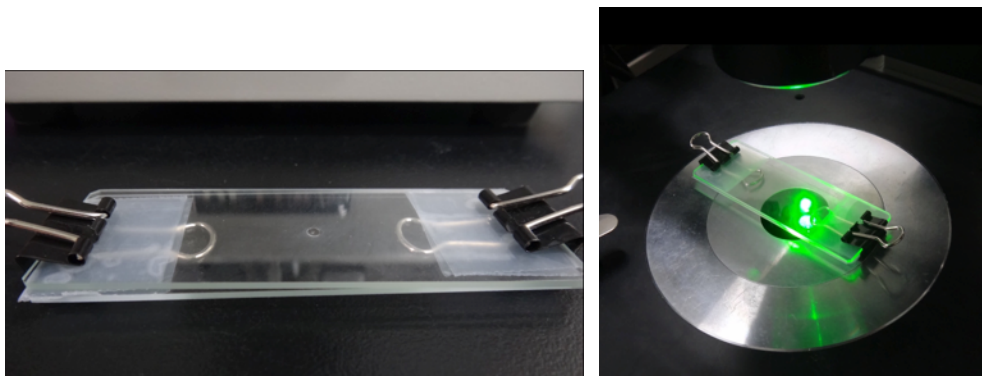


(a)



(b)

圖 9 以 uPIV System 測量線蟲運動的(a)實體設備與(b)架構示意圖



(a)

(b)

圖 10 測量線蟲運動的(a)載玻片及(b)在顯微鏡下的量測狀況

在螢光模式下，使用高速照相機(GX-3, NAC)拍攝連續的顆粒圖像，並連續拍攝三至五個線蟲游動週期。然而，當線蟲的游動週期不明顯甚至幾乎癱瘓時，則以拍攝固定秒數作為觀測結果。過程中，為了避免嚴重的顆粒沉降（約 1.7 分鐘），測量過程必須設計在 1 分鐘內完成。在小液滴中，線蟲將自身擺動的總能量分散於周圍的液體。因此，將會拍攝到螢光顆粒的移動。從這些顆粒的速度及其改變量，則可導出線蟲運動的動能(kinetic power)，做為本研究運動差異比較的依據。此外，因為考慮到液滴圓周附近的曲率可能會使圖像失真，因此僅有當線蟲位於液滴的中心時才獲取圖像。速度場則由免費軟體 JPIV 來計算，其中具有 16x16 像素的分析窗口和 50%的重疊(overlap)來計算顆粒的移動，如圖 11 所示。在圖 13 的結果中，如果出現不在液滴內的其他向量數據將會被刪除，因為這些向量數據與線蟲的運動無關[10][11][12]。

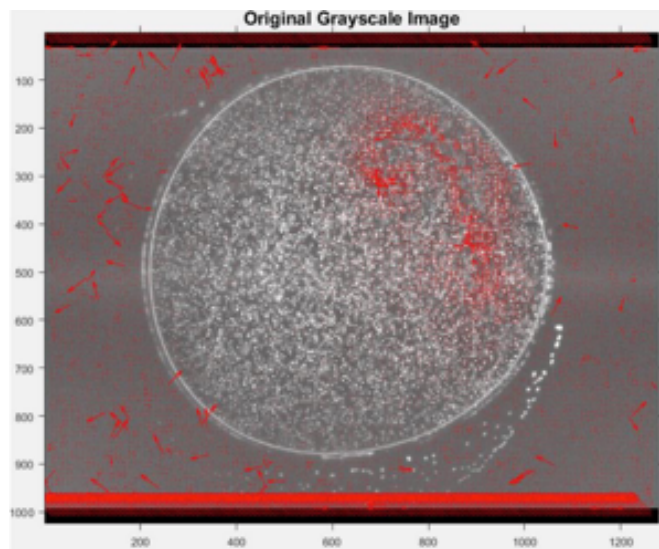


圖 11 使用 JPIV 計算的圖像

#### (五) 動能(kinetic power)的計算

在單一液滴中，線蟲的運動是擾動液體的唯一來源，因此，液體經擾動後所產生的動能等效於由線蟲施加的能量。由於液體流動時與玻璃壁摩擦造成的能量耗散量值過小且觀測的聚苯乙烯顆粒並沒有與玻璃壁接觸，因此暫不考慮摩擦力，然而，在實際流動中，必須考慮來自頂部和底部玻璃壁的剪力所導致的能量損失。

假設每個單位液體 ( $m_i$ ) 透過封閉系統中線蟲的水平力 ( $F_i$ ) 移動，力關係為

$$F_i - R_i = m_i a_i$$

其中  $R_i$  是來自玻璃壁的摩擦力， $a_i$  是每個單位液體的加速度，為了便於分析，每個被拍攝的粒子圖像被分成多個質問窗，而質問窗的面積、高度和質量分別被表示為  $A_i$ 、 $H$  和  $m_i$ ，但由於所有質問窗具有相同的幾何形狀，因此  $A_i$  和  $m_i$  可以進一步簡化為  $A$  和  $m$ ，而每個質問窗的瞬時速度可以基於空間交叉關聯算法(spatial cross-correlation algorithm)從一對圖像導出，最後，再由每兩個速度值導出加速度值，而當獲得每個流體單位的質量、加速度和位移時，則可以確定其動能。

在低雷諾數(low Reynolds number)下，速度分佈達到拋物線在非常短的距離和時間內。雖然虛焦平面(與鏡頭距離為虛焦距的平面)在樣本厚度的中間，但是由於較厚的相關深度( $z_{\text{corr}} = 55 \mu\text{m}$ )，當下成像系統測量的速度( $u_i$ )仍是拋物線速度分佈的平均值。因此，測量的速度僅等於最大速度( $u_{\text{max}}$ )的三分之二，由於該尺度的邊界條件可以被視為無滑移，所以剪切流率近似為 $(u_{\text{max}} - 0)/(H/2)$ 。通過考慮所有前進的影響，對玻璃壁的剪力之預估值為

$$\tau_i = \mu \frac{\partial u}{\partial h} \approx k\mu \frac{u_{\text{max}} - 0}{H/2} = \mu \frac{6u_i}{H}$$

其中  $\mu$  是流體的黏度， $u_i$  是每個質問窗的速度( $\sim 2u_{\text{max}}/3$ )，並且  $k$  是從數值模擬導出的經驗係數，其值接近 2。

根據空間交叉關聯算法，每兩個粒子圖像可得到瞬時速度，所以三個連續的粒子圖像可以得到兩個連續瞬時速度，從這兩個連續瞬時速度可以推得加速度。因為  $a = (v - v_0) / \Delta t$ ，所以線蟲的動能可以表示為

$$P = \sum_i^N [(m_i \bar{a} + \tau_i A) \cdot \bar{S}_{Fi}] / \Delta t$$

其中  $\tau_i$  是作用在相鄰液體玻璃壁的剪力， $N$  是質問窗的數目， $S_{Fi}$  是每個質問窗的位移，

其表示為

$$\overline{S}_F = \frac{1}{2}a\Delta t^2 + v_0\Delta t$$

以上所示的所有功率都是線蟲三個游泳週期時間的平均值。同樣地，透過簡單地測量被限制的速度場之技巧，此方法也可以進一步應用於不同水中微生物的運動分析。

#### (六) 統計分析

癱瘓曲線及動能數據皆以 P 值計算方法作為比較依據，其中「\*」為  $P < 0.05$  (顯著)，「\*\*」為  $P < 0.01$  (高顯著)，「\*\*\*」為  $P < 0.001$  (非常顯著)。

## 參、結果

#### (一) 降低 NSY-1 表現會使 TDP-43 突變線蟲運動顯著改善

為確認 Fas 訊息途徑對於 TDP-43 突變線蟲癱瘓之重要性，本研究先透過 paralysis assays 得出 NSY-1 KD 與 L4440 之癱瘓曲線，如圖 14 所示，兩者之間的 P 值為 0.2382，因此並無顯著差異，這可能是因為 NSY-1 KD 線蟲的癱瘓曲線介於 N2(wild type)與 L4440 之間。而在實驗時，發現 NSY-1 KD 隻線蟲運動能力與 L4440 相差甚遠，因此以  $\mu$  PIV system 所得之線蟲個體運動動能較可作為評斷依據。

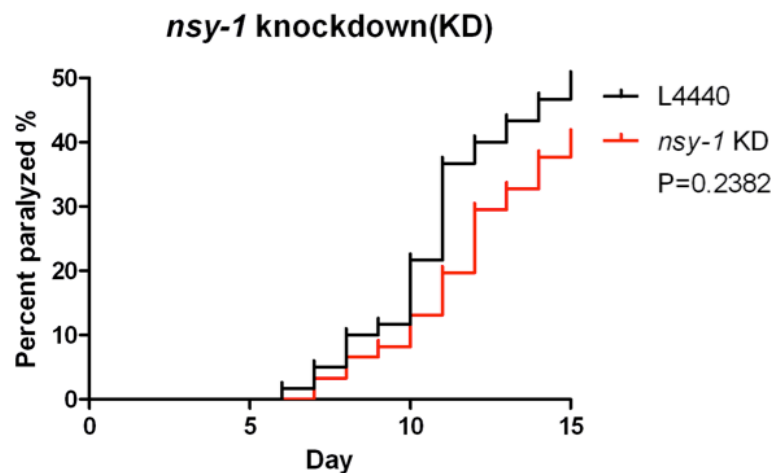


圖 12 NSY-1 KD 與 L4440 之癱瘓曲線



以  $\mu$  PIV system 測量後，得出線蟲之動能如圖 13 所示。由圖中第三天(D3)發現 NSY-1 KD 與 L4440 線蟲運動之動能已有顯著差異，其 P 值為 0.0175，而在第六天(D6)及第九天(D9)則都達到非常顯著差異，P 值都小於 0.0001，可以從其中發現 NSY-1 KD 線蟲從第三天到第九天的動能減少得相當緩慢，而 L4440 則迅速地減少，代表著 NSY-1 KD 後，確實使線蟲之病症有非常顯著且持續性的改善。

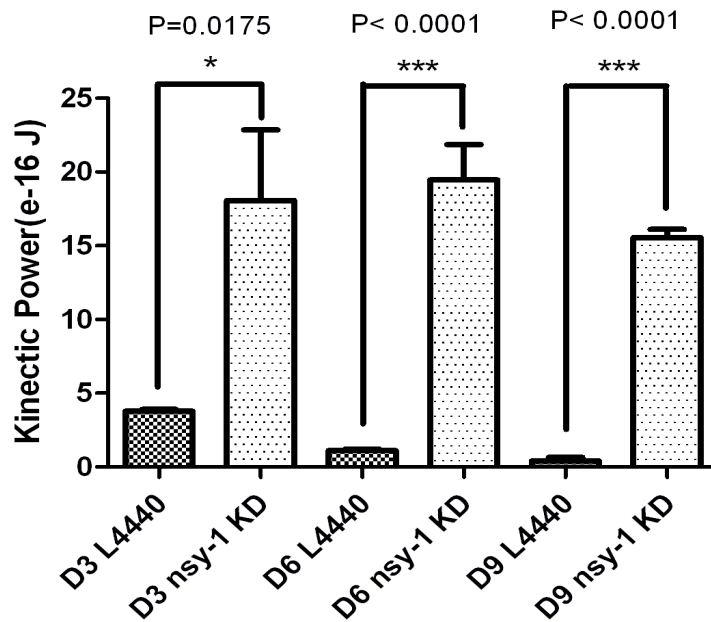


圖 13 NSY-1 KD 與 L4440 之運動動能

## (二) 降低 BLMP-1 表現使 TDP-43 突變線蟲顯著加速癱瘓

由於已確認 Fas 訊息途徑於發病位置之影響是顯著且具持續性的，因此為了確認 BLMP-1 是否有影響該訊息途徑之可能，由 Paralysis assays 所得之癱瘓曲線如圖 14 所示，BLMP-1 KD 線蟲與 L4440 之癱瘓曲線是非常顯著差異，其 P 值小於 0.0001。而以  $\mu$  PIV system 所得之線蟲運動動能比較如圖 15 所示，第三天(D3)可發現 P 值為 0.2555，無顯著差異，而其在第六天(D6)及第九天(D9)分別到達高顯著差異(P 值各為 0.0005 及 0.0006)。由此可見 BLMP-1 確實有調控 Fas 訊息途徑之可能性，因此應確認 BLMP-1 KD 線蟲更加癱瘓之現象是否因為無法在運動神經元內調控 NSY-1 表現量所造成。

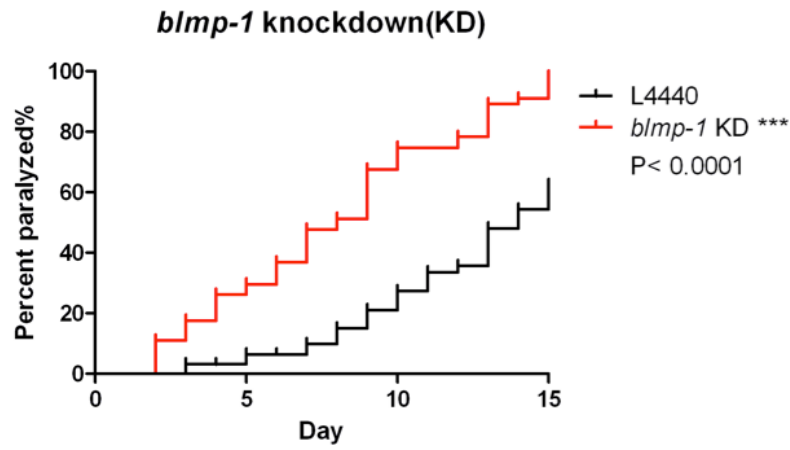


圖 14 BLMP-1 KD 與 L4440 之癱瘓曲線

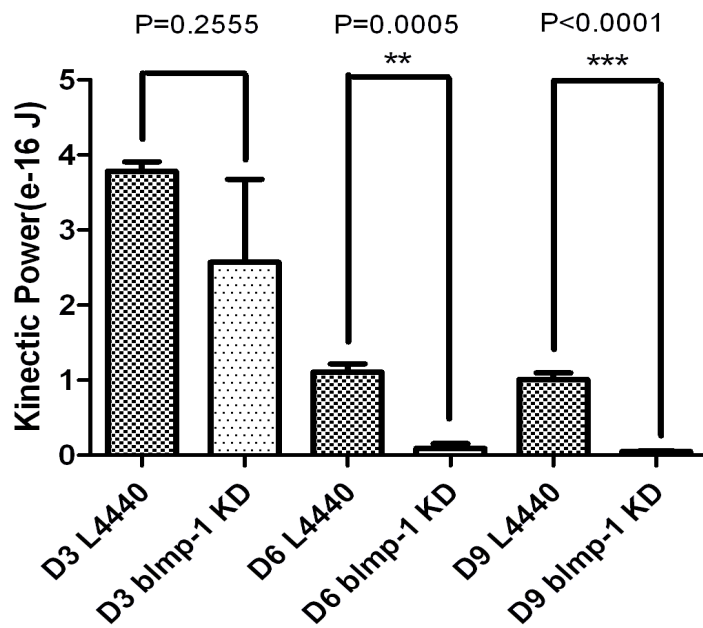


圖 15 BLMP-1 KD 與 L4440 之運動動能比較

(三) BLMP-1 在 TDP-43 突變線蟲運動神經元調控 NSY-1 表現量

由 Paralysis assays 所得之圖 16 中，NSY-1, BLMP-1 KD 與 BLMP-1 KD 線蟲之癱瘓曲線 P 值小於 0.0001，為非常顯著差異。NSY-1, BLMP-1 KD 與 NSY-1 KD 線蟲之癱瘓曲線 P 值為 0.0792，無顯著差異。NSY-1, BLMP-1 KD 與 L4440 線蟲之癱瘓曲線 P 值為 0.4610，無顯著差異。由以上數據中，可以推測 NSY-1, BLMP-1 KD 與 BLMP-1 KD 為顯著差異，明顯說明 BLMP-1 存在於運動神經元內與運動神經元之軸突運輸並無直接關係，反而有參與 NSY-1 表現量之調控。在 NSY-1, BLMP-1 KD，其與 NSY-1 KD 為無

顯著差異，也表示出 BLMP-1 除了調控 NSY-1，對於運動方面並無其他顯著的影響。

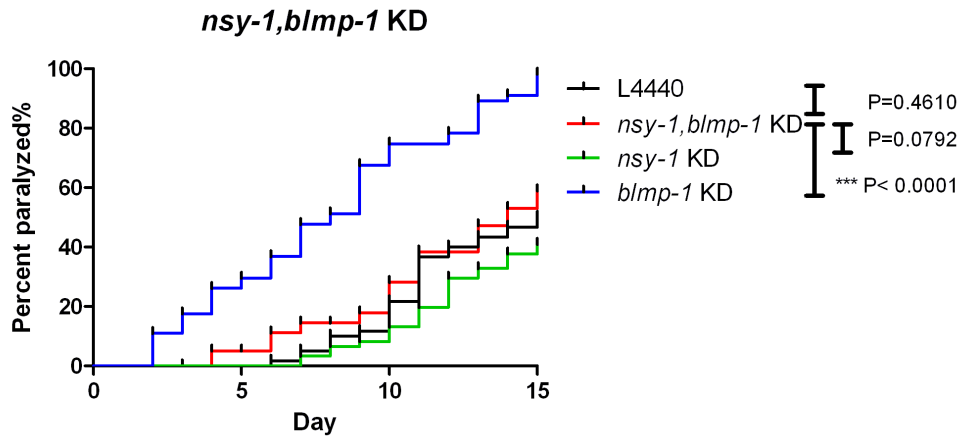


圖 16 NSY-1, BLMP-1 KD 與 NSY-1 KD, BLMP-1 KD, L4440 之癱瘓曲線

以  $\mu$ PIV system 所得之圖 17 中，可發現在第三、六、九天 NSY-1, BLMP-1 KD 線蟲之運動動能皆比 L4440 線蟲大，且皆為顯著差異，P 值皆小於 0.0001。而 NSY-1, BLMP-1 KD 線蟲與 NSY-1 KD 線蟲之運動動能在第三、六天皆無顯著差異(P 值分別為 0.3314 及 0.2190)，而在第九天達到高顯著差異(P 值為 0.0021)，可見 NSY-1, BLMP-1 KD 線蟲之運動情況幾乎與 NSY-1 KD 線蟲無異，故 BLMP-1 與 NSY-1 之間有交互作用，而此交互作用可由前述推論得知為，BLMP-1 降低 NSY-1 表現量。

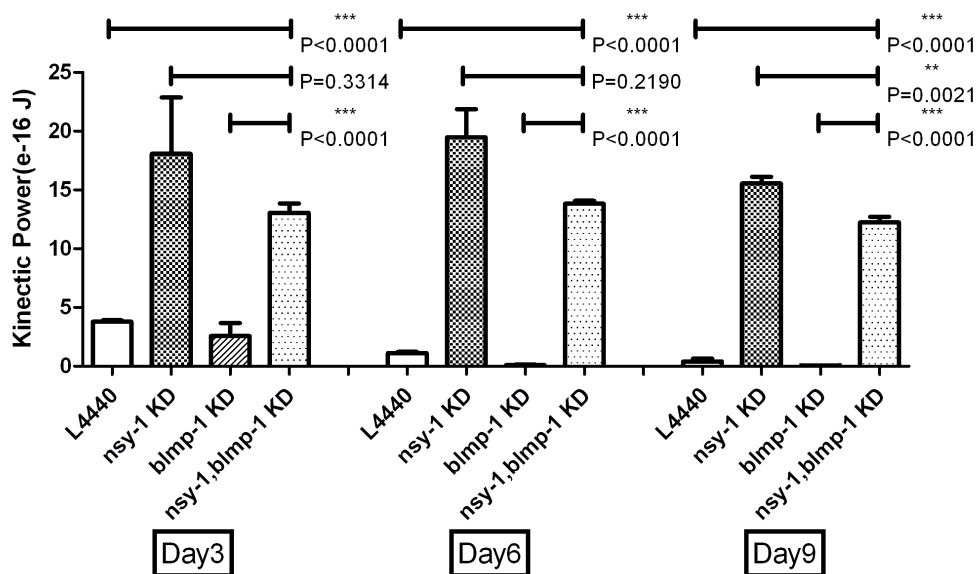


圖 17 NSY-1, BLMP-1 KD 與 L4440, NSY-1 KD, BLMP-1 KD 之運動動能比較

## 肆、討論

Fas 訊息途徑是造成 *SOD1* 突變的漸凍人症患者運動神經元傳訊困難的主因之一。在 TDP-43 突變的線蟲中，本研究也以 NSY-1 KD 證實該線蟲體內的 Fas 訊息途徑也是造成癱瘓的主因之一。在人類患者運動神經元內的 Fas 訊息途徑中，ASK1 為其中磷酸化作用之上游。而在人類的長壽命漿細胞內，PRDM1 作為降低 ASK1 表現量以避免漿細胞凋亡的角色。因此本研究認為將 PRDM1 在患者運動神經元內表達有潛力作為使患者癱瘓病症顯著減緩的方法，因此以線蟲作為模式生物並證明之。

由於線蟲腹側神經索內已被發現 BLMP-1 的存在[9]，但 BLMP-1 是否如同 PRDM1(BLMP-1 之同源蛋白質)調控 ASK1 一般地調控 NSY-1 仍未被發現，因此本研究將 NSY-1 KD、BLMP-1 KD 及 NSY-1, BLMP-1 KD 線蟲之間的癱瘓程度互相比較以證明其存在與否，並且同時證明 BLMP-1 在 TDP-43 突變線蟲腹側神經索內會調控 NSY-1，因此將 BLMP-1 過量表現可作為降低患病線蟲之癱瘓程度的方法。

在本研究的實驗中，NSY-1 KD 與 L4440 的癱瘓曲線雖無顯著差異，但兩者之運動動能卻在第六日到達非常顯著差異，代表 TDP-43 突變線蟲運動神經元內，Fas 訊息途徑確實顯著地使其傳訊困難。而 BLMP-1 KD 與 L4440 的癱瘓曲線為非常顯著，兩者之運動動能也在第九日達到非常顯著差異，因此在「BLMP-1 調控 NSY-1 表現量」的假設下，此結果相當合理，但仍須證實此假設之真偽。在 NSY-1, BLMP-1 KD、NSY-1 KD、BLMP-1 KD 及 L4440 之癱瘓曲線比較中，可推測出兩種可能，一種可能為 BLMP-1 會調控 NSY-1 表現量，但因 BLMP-1 量過少而不足以完全抑制 NSY-1 promoter，造成 NSY-1, BLMP-1 KD 線蟲在癱瘓曲線並無顯著改善，依此假設，線蟲個體的運動能力則將會改善，另一種可能為 BLMP-1 與 NSY-1 各別影響 TDP-43 突變線蟲的運動能力，因此可推測出 BLMP-1 為線蟲使正常運動不可或缺的因子，而 NSY-1 則是因為 TDP-43 突變所產生出作為使線蟲癱瘓的因子，因此若將 TDP-43 突變線蟲 NSY-1, BLMP-1 KD 後，將造

成線蟲個體癱瘓程度惡化。由以上推測，BLMP-1 調控 NSY-1，取決於 NSY-1，BLMP-1 KD 之線蟲個體運動能力是否改善。而在這些線蟲運動動能的比較中，發現 NSY-1, BLMP-1 KD 與 L4440 線蟲之運動動能是非常顯著差異，且為 NSY-1, BLMP-1 KD 之動能較高，而 NSY-1, BLMP-1 KD 與 NSY-1 KD 線蟲之運動動能幾乎無差異，由此兩結果可推得 BLMP-1 降調節 NSY-1，也同時確認 BLMP-1 會在運動神經元中可降低 NSY-1 表現量。因此，PRDM1 是否可在 *SOD1* 突變之漸凍人症患者的運動神經元內降調節 ASK1 是相當有潛力的研究方向。

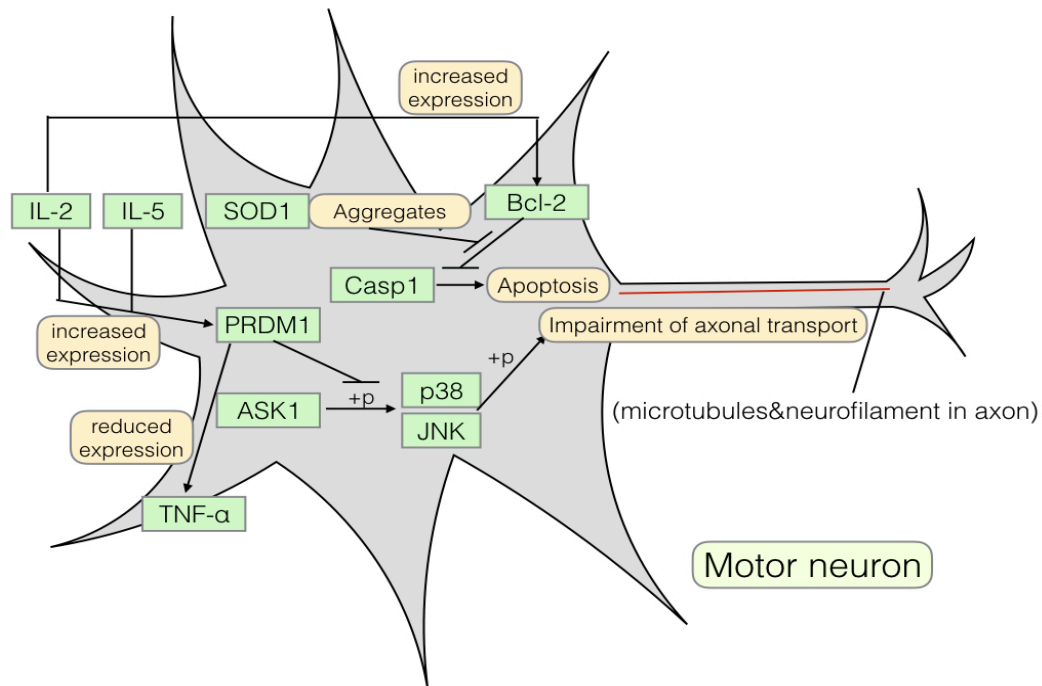
## 伍、結論及未來展望

由於 Fas 訊息途徑對 *SOD1* 突變之漸凍人症患者的運動障礙具有相當影響力，而推測 BLIMP1 可在運動神經元內調控 ASK1 表現量，以改善患者的運動障礙。本研究推論 Fas 訊息途徑在 TDP-43 突變線蟲運動神經元中具有類似的作用，因此將 NSY-1 (ASK1 的同源蛋白質) 降低表現，發現其運動障礙顯著改善，從而確定 *TDP-43* 突變線蟲作為本研究的動物模式之適當性。為了確認 TDP-43 突變線蟲運動神經元內的 BLMP-1 調控 NSY-1 表現量，因此先將 BLMP-1 降低表現，再將 NSY-1 及 BLMP-1 降低表現，並將兩者之癱瘓程度與對照組比較，發現 BLMP-1 降低表現後線蟲運動障礙顯著惡化，而 NSY-1 及 BLMP-1 降低表現後線蟲運動障礙顯著改善，進而證明 TDP-43 突變線蟲運動神經元內 BLMP-1 之表現會減少 NSY-1 表現量。

但本研究目前缺乏直接的生化證據，因此將會以 western blot 檢測 BLMP-1 降低表現時，線蟲體內的 pPMK-1(NSY-1 磷酸化作用之下游)表現量是否增加，以證明 BLMP-1 是否降低 NSY-1 表現。

未來可能以 IL-2(interleukin-2)及 IL-5(interleukin-5)嘗試刺激神經元產生 BLIMP1 以使 ASK1 表現量減少，同時，BLIMP1 量的增加會降低 TNF- $\alpha$  表現量，使運動神經元內的 Fas 訊息途徑較難被活化。此外，IL-2 會增加神經元及神經膠細胞的 Bcl-2(B-cell

lymphoma 2) 表現量，如此便可以減緩 Bcl-2 因 SOD1 突變蛋白的聚集而被抑制的情況。由於在患者運動神經元內 Bcl-2 會抑制 Caspase1 (Interleukin-1 converting enzyme) 的下游所造成的細胞凋亡，因此若以 IL-2 增加 Bcl-2 的表現量，則將可能延長運動神經元及神經膠細胞之壽命，同時因產生 BLIMP1 而減緩 Fas 訊息途徑對軸突所造成的運輸障礙 (圖 18)。



## 陸、參考文獻

- [1] [http://www.mnda.org.tw/Pages\\_Show.asp?AD=3,11&FID=5&ID=229](http://www.mnda.org.tw/Pages_Show.asp?AD=3,11&FID=5&ID=229) ,Taiwan Motor Neuron Disease Association
- [2] <http://www.cureffi.org/2015/04/30/how-do-sod1-mutations-cause-als/> ,CureFFI.org
- [3] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M and Tanabe M. (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*.44(D1),457-62.
- [4] Kanehisa M and Goto S.(2000) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 28(1),27-30.

- [5] <http://www.nature.com/nrn/journal/v14/n3/full/nrn3380.html>, Nature Reviews Neuroscience.
- [6] **Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G and Pettmann B.**(2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas(potentiation by ALS-linked SOD1 mutations).*Neuron*.35(6),1067-1083.
- [7] **Lin FR, Huang SY, Hung KH, Su ST, Chung CH, Matsuzawa A, Hsiao M, Ichijo H and Lin KI.**(2012) ASK1 promotes apoptosis of normal and malignant plasma cells.*Blood*.120(5),1039-1047.
- [8] **Vérièpe J, Fossouo L and Parker JA.**(2015)Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nature Communication*. 6,7319.
- [9] **Reece-Hoyes JS, Shingles J, Dupuy D, Grove CA, Walhout AJ, Vidal M and Hope IA.**(2007) Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* promoterome-driven expression patterns. *BMC Genomics*.8:27.
- [10] **Chuang HS, Gui L and Wereley ST.**(2012) *Microfluid. Nanofluid.*13, 49.10.1007/s10404-012-0939-1.
- [11] **Kumar A, Chuang HS and Wereley ST.**(2010) Dynamic manipulation by light and electric fields: micrometer particles to microliter droplets. *Langmuir*.26(11),7656-60.
- [12] **Santiago JG, et al.**(1998)*Exp. Fluids* 25, 316.10.1007 /s003480050235.

## 【評語】 090018

此研究探討 Sod-1 突變之漸凍人症之線蟲模式中的 BLMP-1 與其運動障礙之間的關係：

1. 線蟲之 paralysis assays 之方法再解釋清楚。
2. BLMP-1 處理之後(KD)之下游基因表現需再確定(西方墨點)。
3. 利用何種統計方法需表示。