2023 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　**050015**

參展科別　動物學

作品名稱　利用粒線體 ***UQCRC1*** 基因缺失之巴金森氏症果蠅模式探討細胞自噬作用對於神經系統退化之影響

得獎獎項

就讀學校　國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師　詹智強、張瑜紋

作者姓名　葉胤璿

關鍵詞　粒線體、巴金森氏症、細胞自噬

作者簡介

我是師大附中數理資優班高二生葉胤璿，在高一時有機會到台大醫學院實驗室參觀，深深對於探討未知的科學感到著迷，也喜歡自己動作做實驗，驗證自己觀察到的現象。很幸運的有機會可以到台大生理所詹智強老師的實驗室學習，讓喜歡動手做實驗的我，可以利用實驗設計證實我的假設，每每寫下實驗步驟時，我都在想這實驗背後的設計想法是什麼？像推理的動腦過程很是有趣！期許未來自己可以有能力連結課內知識與自我探索學習的經過，內化為自己的知識。並期勉自己可以獨立發掘問題、建立假說、設計相關實驗、分析結果與問題討論與延伸，探討生物奧妙有趣的世界！

摘要

巴金森氏症是最常見的神經退化性疾病之一，目前尚無根治之法。研究已知，粒線體如果出現問題，會加速神經細胞退化。細胞自噬作用可協助清除功能不佳的粒線體，以維持神經細胞運作。電子傳遞鏈第三複合體核心中的 *UQCRC1* (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 1) 基因點突變會導致巴金森氏症。然而，細胞自噬作用對於 *UQCRC1* 引起神經退化影響的仍不清楚。本研究中，在果蠅神經系統以 RNA 干擾方式降低 UQCRC1 表現量，建立巴金森氏症模式；而後利用不同藥物分別抑制或促進細胞自噬作用，觀察果蠅爬行能力；同時，利用 MARCM 遺傳工具，使果蠅組織細胞分為 *UQCRC1* 缺失和正常細胞兩群，觀察細胞自噬相關的蛋白表現量在兩群細胞間的差異。研究結果顯示細胞自噬對 *UQCRC1* 參與的粒線體功能缺損的神經退化有代償作用。

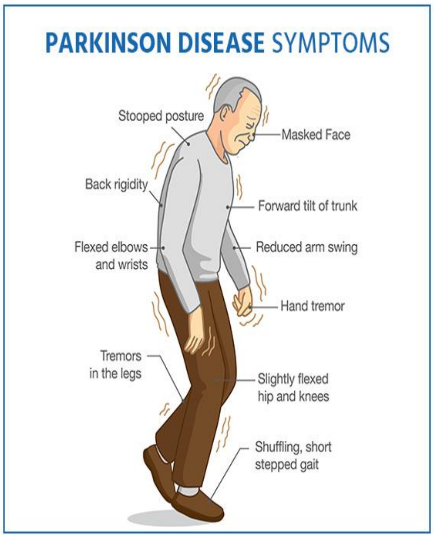
Abstract

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorders without cure yet. Evidence has shown that mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of PD. These dysfunctional mitochondria could be removed through autophagy process to maintain proper function of neurons. Recent studies have identified that mutations in *UQCRC1* (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 1) gene contribute to familail PD. However, the interaction between autophagy and *UQCRC1* -related neurodegeneration remains unknown. I hypothesized that the protein expression and function of autophagy will be increased or activated in cells that loss of *UQCRC1.* In this study, I established a PD *Drosophila* model system by using neurons-specific RNA interference drvien by pan-neuronal Elav-Gal4 to knock down the neuronal expression of UQCRC1. This fly model recapitulates human PD phenotype with age-dependent progressive locomotor defect and dopaminergic neuronal loss. We then applied inhibitors or fasiclitators of autophagy to observe the rescue of motor function in *UQCRC1* RNAi flies. Autophagy inhibitors significantly reduced the motor fucntion of *UQCRC1* RNAi flies compared to control flies. Notably, fascilitators of autophagy partially rescued the results of climbing assay in *UQCRC1* RNAi flies. Further mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) clone approach showed that autophagy markers were increased in *UQCRC1* knockout cells. This study strengthens the interaction between autophagy and mitochondria dysfunction in the PD process.

壹、研究背景

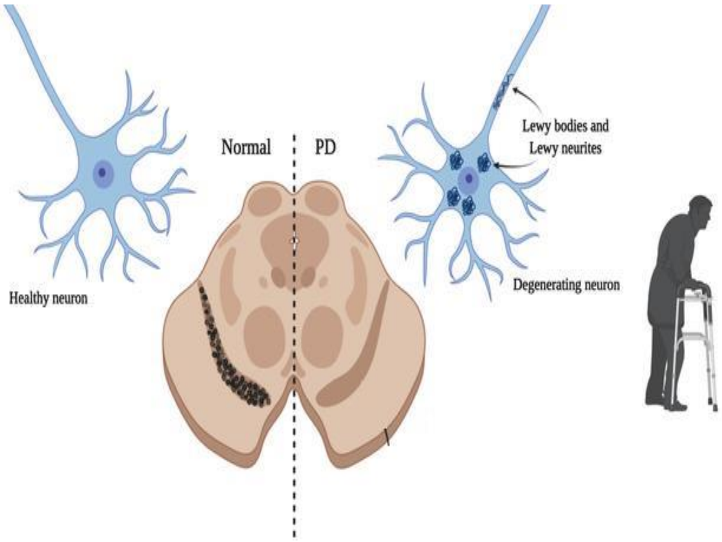
一、巴金氏症(Parkinson's disease)：

巴金森氏症(Parkinson's disease)是除了阿茲海默症(Alzheimer's disease)之外最普遍的神經退化性疾病，在全球人口老化下，60 歲以上長者約有 1~2%罹患此症，男性又較女性多，患病風險隨年齡增長遽增。巴金森症病患會出現漸進式動作遲緩，肢體僵硬，面具臉，說話聲音變小，顫抖與走路小碎步等症狀(圖一 A)，也在後期合併有認知功能障礙之症狀。巴金森氏症在病理上最主要是腦幹的多巴胺神經細胞的退化死亡，而殘存的神經細胞中出現以α-Synuclein 為主成分異常蛋白累積，形成路易氏體(Lewy bodies)(圖一 B)。目前尚無方法可以清除α-Synuclein，所以無法根治巴金森氏症，病患隨年齡增加而疾病益趨惡化，所需服用的藥物會愈來愈多，甚至出現藥物併發症。



圖一、(A)巴金森氏症的症狀

(圖片來源：https://www.medicoverhospitals.in/diseases/parkinsons-disease)

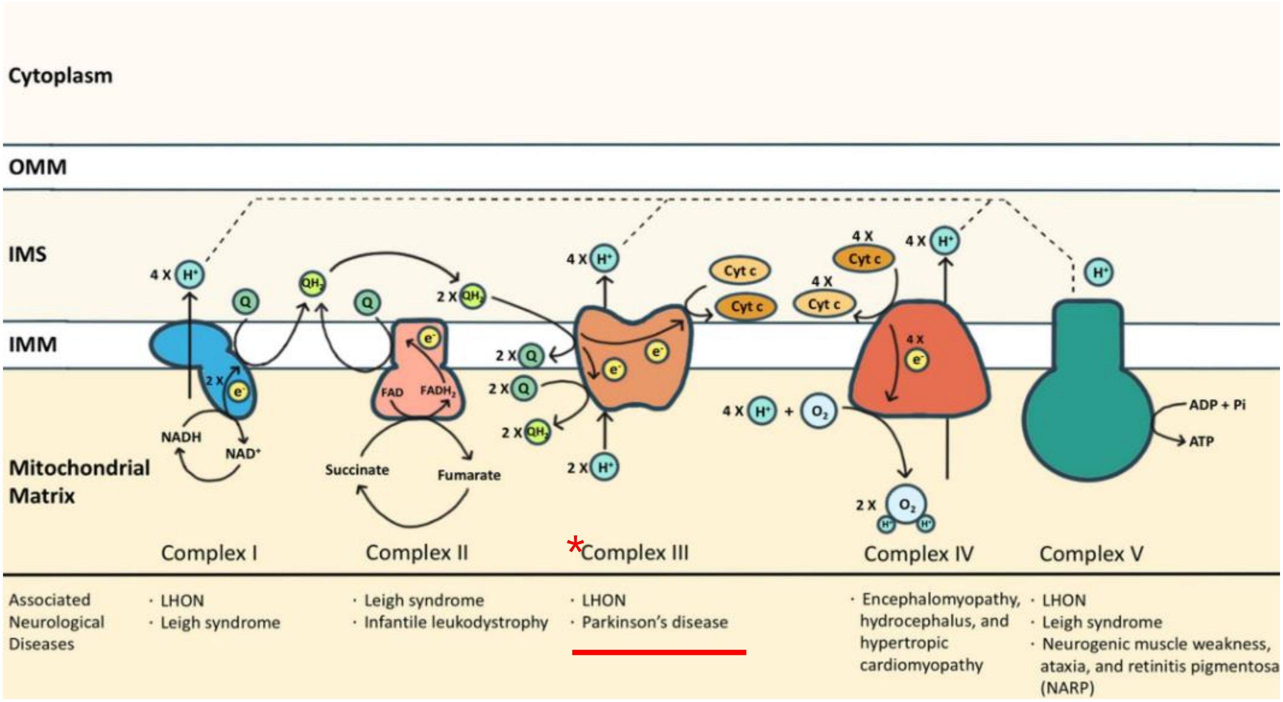


(B)巴金森氏症病患的腦部病理變化。

(圖片來源：Journal of Parkinson's Disease, vol. 11, no. 1, pp. 71-92, 2021)

二、粒線體中的 *UQCRC1* 基因：

粒線體中的 *UQCRC1* (*Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core 1*)基因是近期研究，發現造成巴金森氏症的致病基因。UQCRC1 為粒線體第三傳遞鏈上的核心蛋白，當其功能表現降低或喪失時，會導致神經細胞加速凋亡。在巴金森氏症的遺傳性家族中，藉由次世代基因定序發現，若 *UQCRC1* 發生點突變導致其功能下降，會引起粒線體功能缺損、神經細胞中自由基增加，進而造成巴金森氏症 (Lin et al., Brain, 2020)。文獻指出粒線體電子傳遞鍊上第三複合體的功能，對於多巴胺神經細胞存活與巴金森症致病機轉具有重要影響(圖二)。

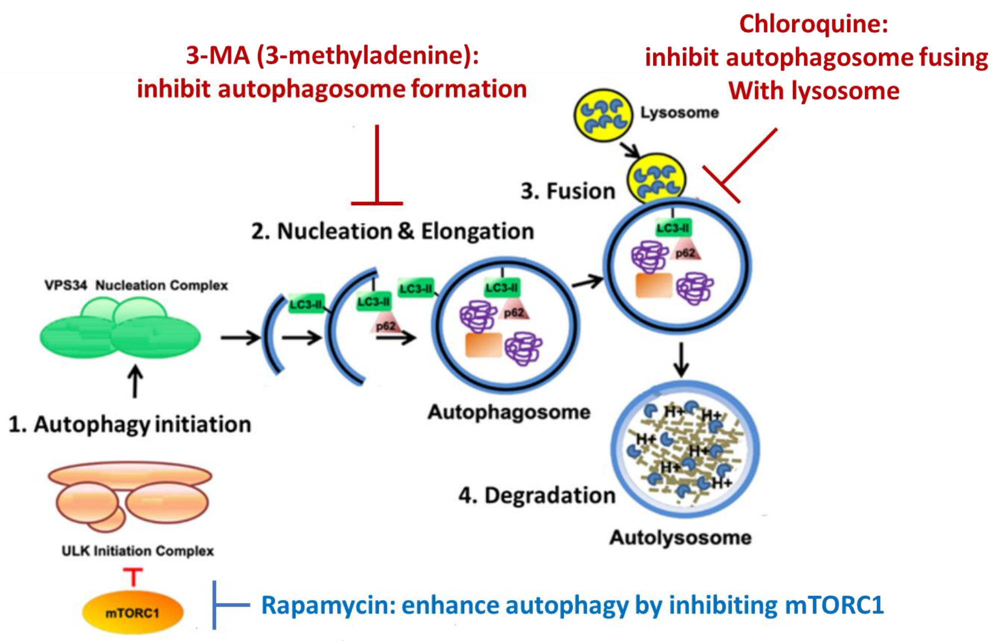


圖二、UQCRC1 為粒線體第三傳遞鏈上的核心蛋白，*UQCRC1* 發生點突變會引起粒線體功能缺損、細胞中自由基增加，會導致巴金森氏症(圖片來源：REVIEW article, Neurosci., 2021)。

三、細胞自噬(autophagy)：

當細胞遭受環境壓力，或細胞內有功能異常的胞器時，這些訊息會誘發細胞內多種脂質及蛋白質形成彎月狀的雙層分隔膜(autophagy initiation)(圖三)。此分隔膜會繼續產生新的膜而逐漸增大形成自噬小泡，裹住受損的胞器或蛋白質。自噬小泡最後會密合成自噬體(autophagosome)，把待分解的物質帶到溶酶體(lysosome)分解。因此將老舊的胞器或蛋白質

分解，並銷毀或回收再利用成為細胞的營養。研究指出，細胞自噬與胚胎分化、細胞分化、壓力的適應等都有關，細胞自噬若失調會導致細胞中異常的胞器或蛋白質累積，不僅會影響細胞功能的正常運作，也可能會導致神經退化性疾病的產生(Chicote J et al., Front Pharmaco, 2020)。



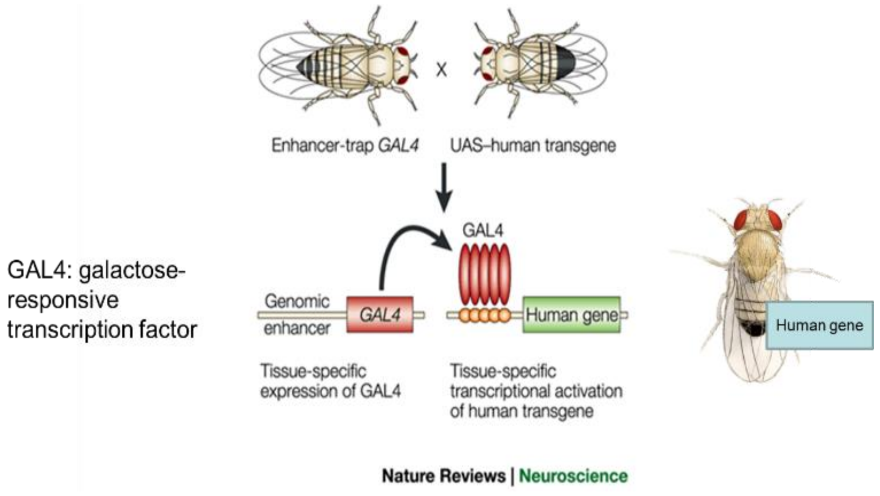
圖三、細胞自噬作用的過程與實驗中所用藥物以促進或是抑制細胞自噬作用。
(圖片來源：修改取自: Chicote J,et al. Front Pharmacol. 2020 Oct 15;11:580343.)

四、以果蠅為模式生物：

果蠅(*Drosophila melanogaster*)約 60%的基因與人類基因為同源基因，而神經退化性疾病的相關致病基因皆在果蠅身上有同源基因，因此本研究將以果蠅為模式動物。

(一) Gal4-UAS (Gal4 upstream activating sequences)系統：

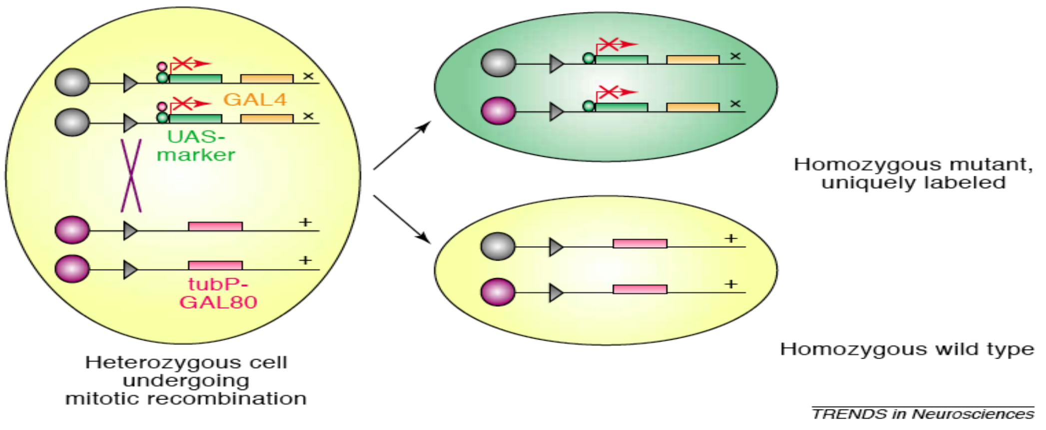
GAL4-UAS 雙元基因表現系統是廣泛被運用在特殊組織或是細胞群表現目標基因的技術，GAL4 是轉錄調控因子，其 binding domain 與 UAS 序列結合後，其 activity domain 和 promoter 區域結合，從而可以誘導目標基因的表現(圖四)。



圖四、GAL4-UAS 系統，藉由在不同組織表達的 Gal4 和與攜帶目標基因或是基因序列的果蠅配對，其子代可以產生於特定組織或是細胞表現的特定基因。

(二) MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker)技術：

MARCM 技術乃結合 UAS-Gal4 系統與 FLP/FRT 系統，FLP 是來自酵母菌的染色體重組酶，而 FRT 為 FLP 催化的一段 DNA 序列。如果把 FLP 和 FRT 通過轉殖基因導入果蠅基因組中，在 FLP 的催化下，含有 FRT 序列的同源染色體會在細胞分裂過程產生重組。同源染色體重組的結果，導致子代產生特定組織為“嵌合體”的細胞(mosaic cells)，某些細胞的標定基因表現量可以減少，或甚至消失，因此子代大部分細胞是正常細胞，可以正常生長發育，可以藉因為這項技術所標記的細胞是正常細胞，而突變細胞沒有標記，可以藉此觀察沒有標記的突變細胞中(目標基因減少)的變化(Lee T et al., Trends in Neuroscience, 2001)。(圖五)



圖五、MARCM 技術，藉 FLP 和 FRT 在細胞分裂過程產生重組，導致子代產生特定組織為“嵌合體”的細胞(mosaic cells)，標定基因表現量於特定細胞可以減少或甚至消失。

(三) RNAi (RNA interferrence)

RNAi 是一種利用小片段的 RNA, siRNA(small interference RNA)或 miRNA (microRNA)，藉由設計的序列可藉由和 messenger RNA 結合，與 Argonaute 蛋白質家族形成複合體(RNA-inducing silencing complex, RISC)，以降解目標 mRNA，達到抑制特定基因的表現(Fire A et al., Nature, 1998)。

貳、研究目的

世界人口日益老化，釐清巴金森氏症神經細胞死亡的機轉，希望未來可針對機轉進行修補，以根治此退化性疾病，減少老化社會的負擔。本研究中，在果蠅神經系統利用 RNAi 方式降低 UQCRC1 表現量，以此建立類似巴金森氏症的模式果蠅；而後利用兩種方式，包含於果蠅食物中加入不同藥物給予分別抑制或促進細胞自噬作用，觀察果蠅爬行能力改善程度，及利用 MARCM 於果蠅眼睛於局部細胞群中去除 UQCRC1，檢測細胞自噬相關蛋白質表現量，以此探討細胞自噬作用對於神經退化之影響。

本研究探討之問題如下：

一、利用 RNAi 方式，建立類似人類巴金森氏症的果蠅模式。

二、利用不同藥物分別抑制或促進細胞自噬作用，探討細胞自噬對 UQCRC1 參與神經系統退化的影響。

三、利用 MARCM 遺傳工具，探討細胞自噬對 UQCRC1 參與的神經系統退化的影響。

參、研究設備與器材

設備：解剖顯微鏡、光學顯微鏡、雷射共軛焦顯微鏡顯微鏡。

藥品：酒精、ddH$_2$O、3-methyladenine (3-MA)、Chloroquine、Rapamycin、N-Acetyl Cysteine (NAC) (皆購自 Sigma-aldrich 公司)。

肆、研究過程與方法

一、實驗假設

當細胞中出現功能不佳的粒線體會誘發細胞自噬，以清除功能失調之粒線體，避免繼續與正常粒線體融合。因此假設在降低粒線體 UQCRC1 之巴金森症果蠅中，添加抑制細胞自噬作用之藥物，將會大幅導致果蠅提早出現動作緩慢病徵；相反的，添加促進細胞自噬作用之藥物，將會改善果蠅的動作功能。MARCM 實驗中，在沒有 UQCRC1 的突變 clone 中，細胞自噬相關蛋白可能會增加表達以補償加強粒線體的分解。

二、實驗流程、材料與方法

(一)實驗流程：

圖六、本研究之實驗流程

(二)果蠅株：

1.建立實驗組與對照組果蠅：

實驗組：*Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 於神經系統中表達針對 *UQCRC1* 的 RNAi

(the oligonucleotide sequence is 5’-AAACATGTACTGCGCTGCGCAAAGC-3’)

對照組：為必免單獨之 *Elav-Gal4* 或是 RNAi 的脫靶 off target 效應，使用 *Elav-Gal4/+* 以及 *Elav-Gal4>UAS-w-RNAi* (random oligonucleotide 序列)

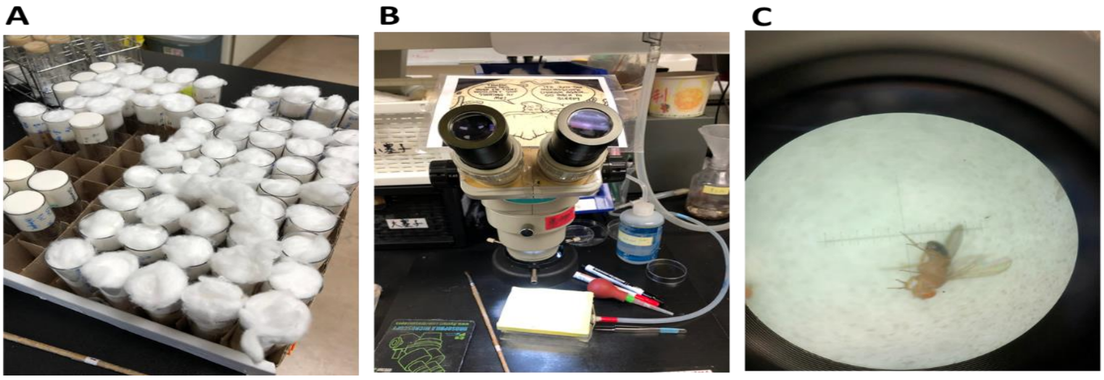
2.實驗流程：

(1)每天至果蠅房收置於 18℃的 homozygous *Elav-Gal4* 處女果蠅。用二氧化碳麻醉果蠅，用解剖顯微鏡觀察(圖七 A，B)，並用羽毛刷子挑選腹部大，白色偏透明並有胎糞斑點的處女果蠅，反之，個頭較小，尾巴有深黑色的為公果蠅。

(2)取 *UAS-UQCRC1-RNAi* 公果蠅 10-15 隻 cross with homozygous *Elav-Gal4* 處女果蠅 20 隻做為實驗組，*Elav-Gal4>UAS-w-RNAi* 公果蠅 10-15 隻 cross with homozygous *Elav-Gal4* 處女果蠅 20 隻做為對照組，另外，*UAS-w* 公果蠅 10-15 隻 cross with homozygous *Elav-Gal4* 處女果蠅 20 隻做為另一對照組。每組 cross 皆有 6-7 管，並置放於 25℃恆溫恆濕培養間，讓它們進行交配，以繁殖出實驗用的子代。

(3)果蠅養在以玉米份、糖、酵母菌和洋菜組成的培養管裡。約 4-5 天換一次食物，每次換食物時都會添加新的藥物於食物 medium 上，以保持給予藥物的新鮮。

(4)每組會在一周後進行 climbing assay,之後換到新的管子，內有新的藥物於食物 medium 上，在隔一周後進行第二周的 climbing assay，以此類推進行到第三周結束。



圖七、(A)果蠅房;(B)解剖顯微鏡與分辨公母果蠅;(C)圖示為公果蠅。

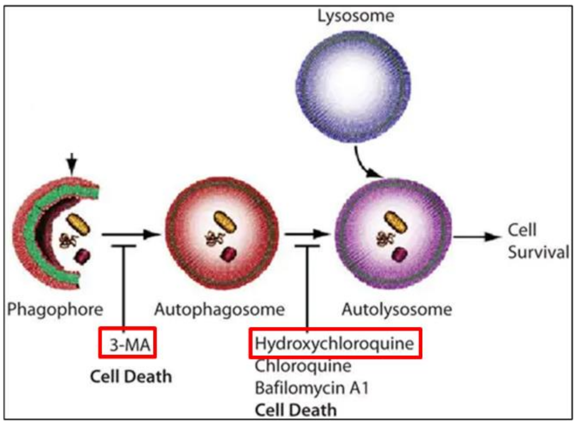
3. 餵食藥物:

以下是本研究中所利用的不同藥物分別抑制或促進細胞自噬作用(圖八)，探討細胞自噬對 UQCRC1 參與的神經系統退化的影響。

A

果蠅培養基添加之藥物	作用機轉
3-MA (3-Methyladenine)	抑制autophagy的產生
Rapamycin	藉由抑制mTORC1，促進autophagy的產生
Chloroquine	抑制autophagosome與lysosome的融合
NAC	抗氧化作用

B



https://www.sigmaaldrich.com/TW/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cancer-research/autophagy-in-cancer-promotes-therapeutic-resistance

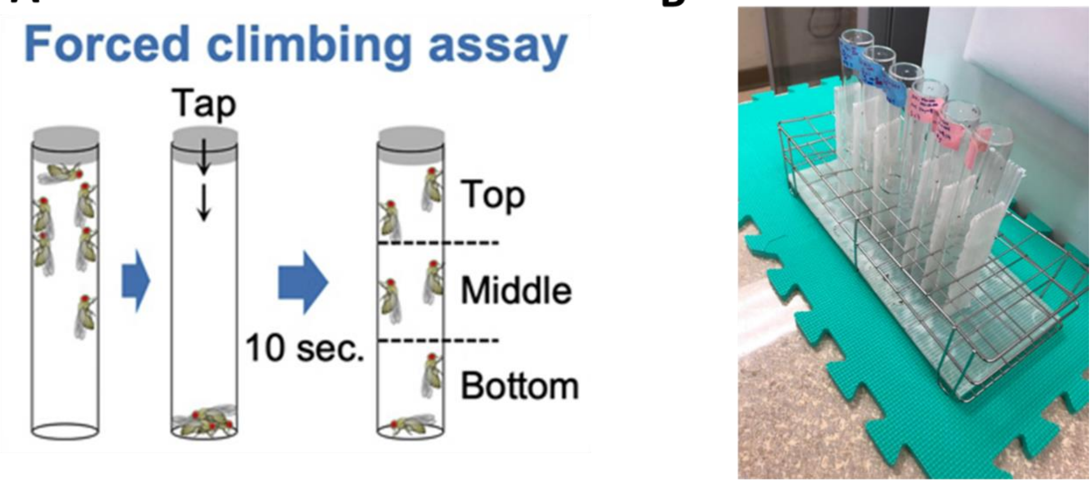
圖八: 本研究所使用之藥物與作用機轉(A)，及其相對應於自噬作用的抑制作用點(B)。

4. 果蠅爬行動作試驗 Climbing assay:

本實驗分別計算不同年齡的巴金森症果蠅以及接受藥物誘發或是抑制細胞自噬作用的果蠅爬行三次(每次爬行中間間隔三到四分鐘)，在固定時間 10 秒鐘後，通過試管八公分處的比例(圖九)。

A

B



圖片來源: Sekiya M, Iijima KM. *STAR* Protoc. 2021; 2(2):100501.

圖九: 果蠅爬行試驗 Climbing assay。(A)果蠅爬行試驗卡通示意圖，(B)於試驗室執行爬行試驗情況，每館標示不同組別的果蠅)。

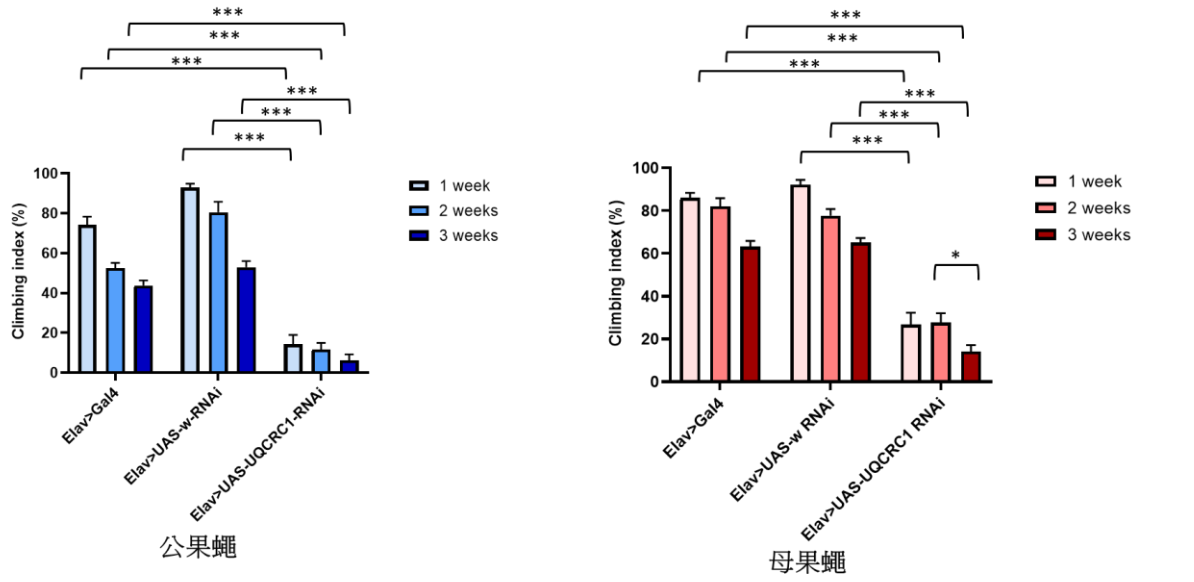
5. 利用果蠅眼睛為平台，以 MARCM 技術建立局部 UQCRC1 缺失的細胞群

在實驗室學姐帶領下，我學習 MARCM 技術，利用 FLP/FRT 系統，使果蠅眼睛組織細胞分為兩群: UQCRC1 缺失和正常細胞，比較兩群細胞的與自噬作用相關的蛋白表現量是否有所差異，例如 GABARAP 和 Ref2P 蛋白。

伍、 研究結果

一. 建立 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅模式

UQCRC1 功能或是表現量降低會影響粒線體功能，可能導致神經退化性疾病巴金森氏症。為驗證過去的論文 (Lin et al., Brain, 2020)，本實驗用 *Elav-Gal4*, 將針對 *UQCRC1* 的 RNAi 表達在果蠅神經系統，並利用爬行動作試驗 climbing assay, 看看相較於對照組(僅表達 *Elav-Gal4* 之親代或是 *Elav-Gal4*-UAS-*w* RNAi(random RNAi oligonucleotide)是否會出現如巴金森症病患一般隨年齡老化的動作緩慢表徵。實驗結果發現，雖然對照組也出現隨年齡增長 (由 1week 大至 3 week 大)動作較慢的情形，但是，實驗組 (*Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi*)顯著相較於對照組，不論性別，會出現隨行動攀爬遲緩的現象，特別是公果蠅較明顯(圖十 A)，呼應巴金森氏症在男性較容易發生。同時，這種動作遲緩的現象，隨著果蠅年齡增長而更顯著(圖十)。



圖十: *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅表現出隨年齡增長的動作功能障礙，公果蠅(A)比母果蠅(B)更為顯著。***代表 $P<0.001$; **代表 $P<0.01$; *代表 $P<0.05$ (Prisim 9.4.1. version)

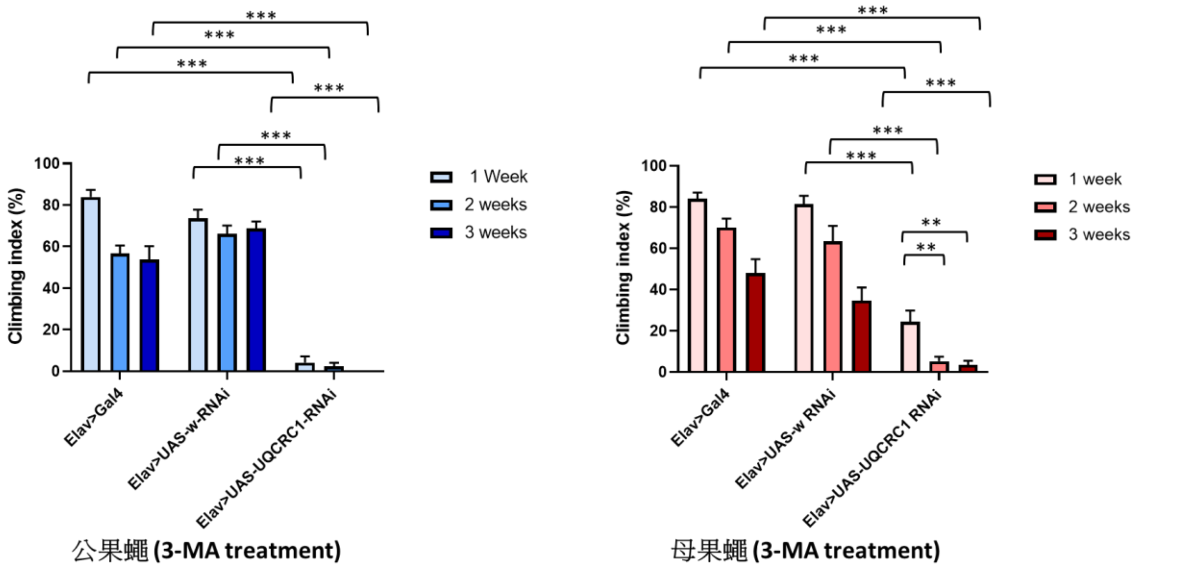
結果顯示，*Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅可以表現出如同巴金森症病患一般隨年齡老化的動作緩慢表徵，並呈現男性較為顯著之特徵。

二. 抑制細胞自噬作用的影響

在上述三個基因型的果蠅中(兩種是對照組)，於果蠅培養基中分別加入兩種可以抑制細胞自噬的作用藥物，3-MA (3-Methyladenine) (抑制 autophagosome 產生，圖八 B)及 Chloroquine (抑制 autophagosome 與 lysosome 的融合，圖八 B)。

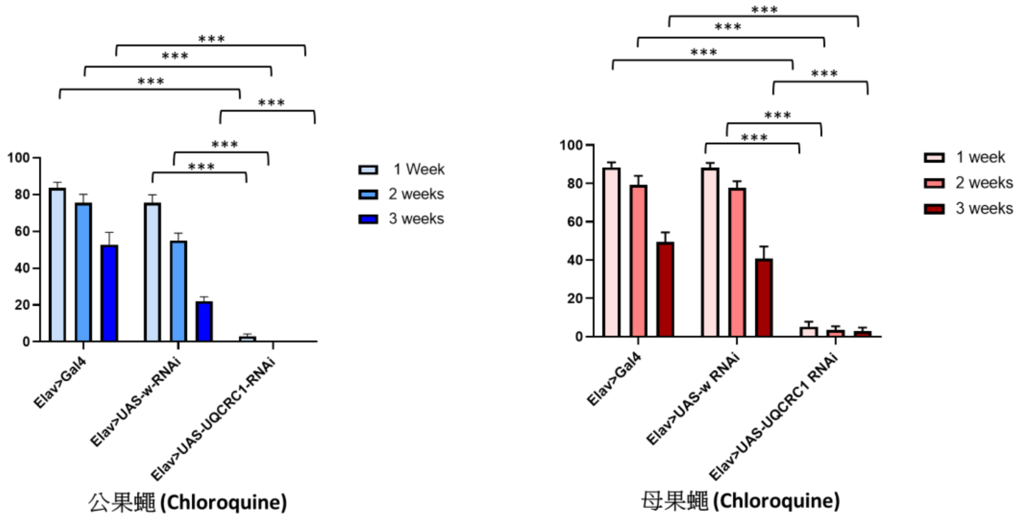
結果發現，相較於對照組，3-MA 對於不論是 *Elav-Gal4* only 對照組，或是 *Elav-Gal4*-UAS-*w* RNAi 對照組的果蠅，僅輕微影響其行動能力(圖十一)。但是在實驗組 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅則會顯著的降低其運動能力(圖十一)。

顯示細胞自噬功能在粒線體功能不佳狀態下如又再抑制細胞自噬，會出現對動作功能障礙的加成 synergistic 效果。



圖十一: 利用 3MA 抑制細胞自噬作用，在 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅表現出對動作功能障礙的加成效果。

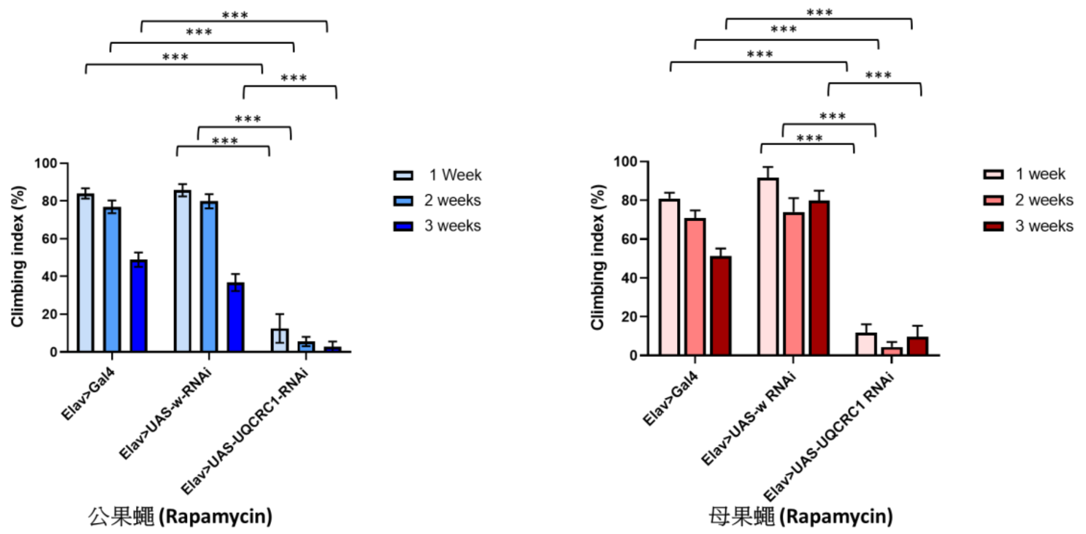
同樣的變化，也於加入另一抑制細胞自噬的藥物 Chloroquine 觀察到(圖十二)。



圖十二: 利用 Chloropquine 抑制細胞自噬作用，在 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅表現出對動作功能障礙的加成效果。

三. 促進細胞自噬作用的影響

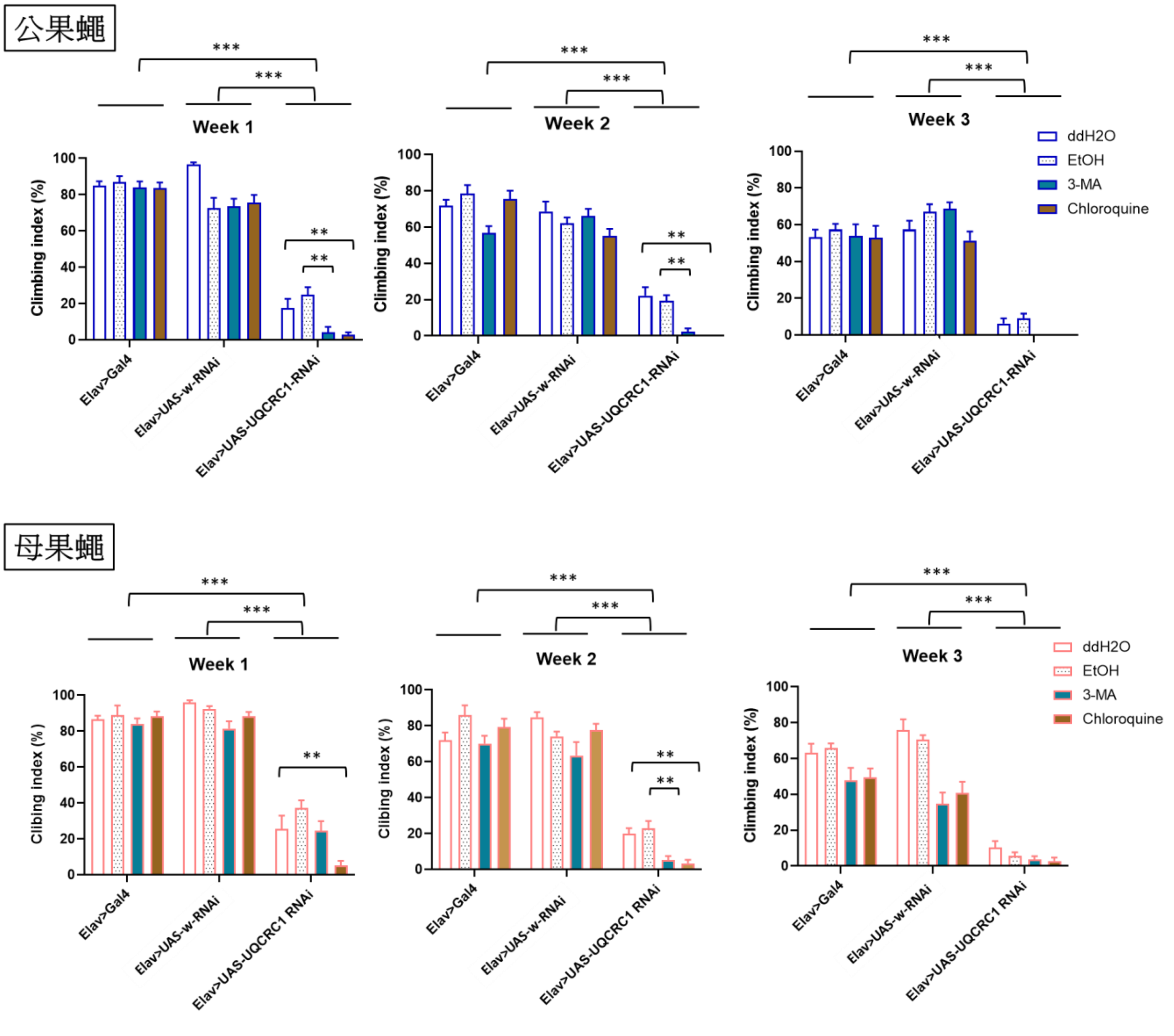
相反的，如果細胞自噬可以清除品質功能不佳的粒線體，那在粒線體 UQCRC1 降低的實驗組 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅，再給予促進細胞自噬作用的藥物 (Rapamycin, 藉由抑制 mTORC1，促進 autophagy 的產生，圖四)，應該可以挽救實驗組動作功能不好的表徵。如同假設，實驗結果觀察到加入 Rapamycin 促進細胞自噬作用後，不論在公母果蠅可以部份改善果蠅爬行動作緩慢症狀，然而，未回到如同對照組的狀態(圖十三)。



圖十三: 利用 Rapamycin 促進細胞自噬作用，在 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅部分改善動作功能障礙。

這樣的結果顯示，利用 Rapamycin 促進細胞自噬，僅能部分挽救 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 實驗組果蠅的運動功能障礙。

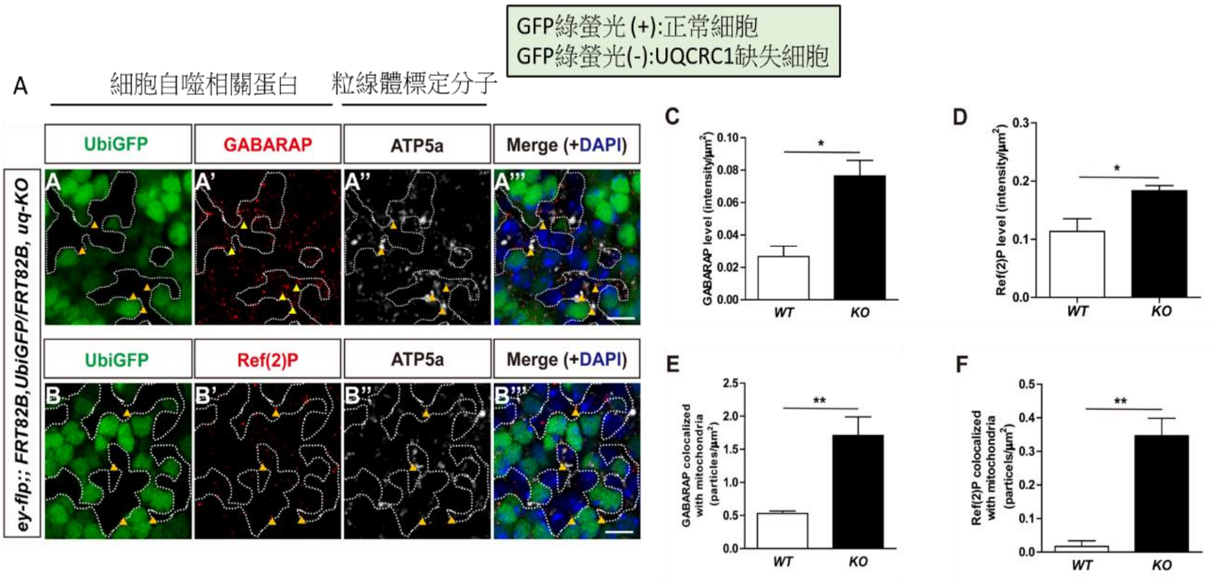
將抑制(3-MA 與 chloroquine)與促進 (Rapamycin) 細胞自噬合併整理如下(圖十四)，顯示促進細胞自噬的 Rapamycin 與 positive control 降低氧化壓力的 NAC (N-Acetylcysteine) 改善 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 實驗組果蠅的效果於第一周年輕果蠅的最好(達到統計上顯著差異 *P*<0.01)，這種 rescue effect 會隨年齡遞減，顯示 aging 老化本身亦會持續病程的進展。



圖十四:整理抑制或是促進細胞自噬相較於 solvent control 與 positive control (NAC，降低氧化壓力)在 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅運動功能的影響 (分成公果蠅與母果蠅比較)。

四. 利用 MARCM 工具，探討細胞自噬在 *UQCRC1* 缺失的神經系統的變化。

接著，利用 MARCM 技術，以果蠅眼睛為平台，建立局部 *UQCRC1* 缺失的細胞群，使果蠅眼睛組織細胞分為兩群: *UQCRC1* 缺失(沒有 GFP 綠色螢光)和正常細胞(有 GFP 綠色螢光)，實驗結果觀察發現，在 *UQCRC1* 缺失(沒有 GFP 綠色螢光，圖十五 A，用白色虛線框出的黑色區塊)中，標定為紅色螢光訊號的 GABARAP 與 Ref2P 與細胞自噬相關的蛋白表現顯著上升(統計: GABARAP 圖十五 B; Ref2P 圖十五 C, *P*<0.01)。這些表現增加的自噬作用蛋白與粒線體(用 ATP5a 作為標示)有很大的比例細胞中的定位相同(co-localization) (圖十五 E,F, *P*<0.01)。顯示，在喪失 *UQCRC1* 情況下，細胞自噬的蛋白質表現量上升，並集中往粒線體的位置，暗示著可能想代償清除功能不佳的粒線體。



圖

圖十五: 實驗結果發現在 *UQCRC1* 缺失的細胞中，細胞自噬相關蛋白表現量會顯著增加(圖 A-圖 B’’‘，圖 C 和 D 為量化結果)，這可能表示自噬作用被活化，因此需要這些蛋白大量表現。我們也發現除表現量增加，這些蛋白和粒線體的位置有高度重疊(圖 E-圖 F)，這表示這些蛋白可能是針對粒線體進行自噬作用。

陸、 討論

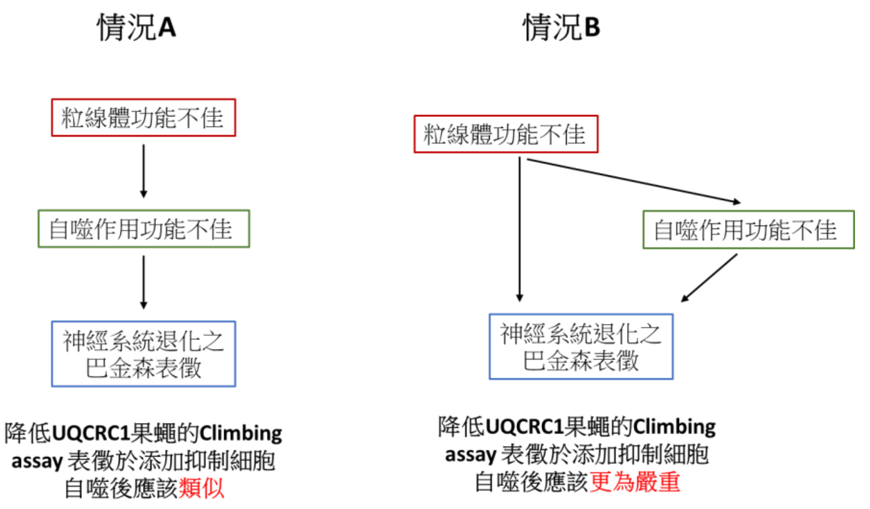
本研究利用在神經系統以 RNA 干擾方式降低 *UQCRC1* 表現量，建立巴金森氏症果蠅模式，出現同病患一般隨年齡老化動作功能逐漸下降的表徵，呼應前人的研究結果；爾後，利用不同藥物分別抑制或促進細胞自噬作用，我發現在粒線體功能不佳狀態下的實驗組果蠅如又再抑制細胞自噬，會出現對動作功能障礙的加成 synergistic 效果。相反的，如果促進細胞自噬，雖能挽救 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 實驗組果蠅的運動功能障礙，但是挽救效果有限，改善實驗組果蠅的效果於第一周年輕果蠅的最好，這種 rescue effect 會隨年齡遞減，顯示 aging 老化本身亦會持續病程的進展。後續的 MRACM 實驗，雖如預期看到，在 UQCRC1 缺失的細胞中，細胞自噬相關蛋白表現量會顯著增加，這可能表示自噬作用被活化，因此需要這些蛋白大量表現。我們也發現除表現量增加，這些蛋白和粒線體的位置有高度重疊，這表示這些蛋白可能是針對粒線體進行自噬作用。此部分的實驗支持本實驗在藥物處理的實驗中，發現促進 Rapamycin 可以改善 UQCRC1 降低的果蠅動作功能，但是卻不是 100%恢復到如對照組情形。

目前的初步報告，證明粒線體功能對於維持神經系統對於動作控制的重要性，同時，亦驗證過去前人發現的粒線體蛋白 UQCRC1 的重要性。此外，藉由觀察果蠅的表徵與型為測試，可以觀察到與病患類似的漸進式動作障礙。最有趣的是，抑制細胞自噬作用，可以在表達 UQCRC1 RNAi 的果蠅大幅度影響果蠅的行動能力，這現象在三周大的年長果蠅現象更是明顯。暗示細胞自噬作用與粒線體功能間的交互作用會影響神經系統的完整性。

然而，針對促進細胞自噬雖可挽救，但非 100%回到對照組的不如預期的結果，假設在降低粒線體 UQCRC1 情形下的果蠅，再抑制細胞自噬，可能會有兩種情況 (圖十六):

情況 A: 假設細胞自噬可以如同教科書中所說清除所有品質功能不佳的粒線體，那在粒線體 UQCRC1 降低的實驗組 *Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 果蠅，再給予抑制細胞自噬，應可完全恢復動作功能。抑制細胞自噬後，降低 UQCRC1 果蠅的 Climbing assay 表徵於應該類似於在加入抑制細胞自噬。粒線體功能不佳與細胞自噬的機轉是垂直上下游關係。

情況 B: 粒線體功能不佳與細胞自噬的機轉與交互作不是單純的垂直上下游關係。在降低 UQCRC1 果蠅的 Climbing assay 表徵於添加促進細胞自噬後僅能部分改善，更為嚴重 (加成效果 synergistic effect)，暗示細胞內除細胞自噬作用外，應該還有其他機制可以代償粒線體功能不佳。相反的，在降低 UQCRC1 果蠅並抑制細胞自噬後，動作緩慢表徵更為嚴重 (加成效果 synergistic effect)，代表，細胞自噬另有一與粒線體功能無關的途徑導致運動神經系統退化，因此才會出現更加嚴重的動作表徵。



圖十六: 根據本研究結果推理出的在降低粒線體 UQCRC1 情形下與細胞自噬交互作用的兩種可能情況。

目前的研究結果指向，粒線體功能與細胞自噬間的作用於神經系統應該是偏向情況 B 的假設，兩者之間並非垂直之上下游關係。後續尚須進一步的實驗來釐清兩者間的交互作用於神經細胞退化過程中扮演的角色。

柒、 結論與未來展望

本研究藉由於神經系統降低新穎巴金森氏症致病基因*UQCRC1*表現量以重現此病症的隨年齡日趨嚴重的動作障礙，並藉由添加藥物與基因遺傳工具，操縱細胞自噬，發現在神經細胞中，細胞自噬雖可以部分補償粒線體功能缺失的結果，但並非垂直之上下游關係，同時，此補償改善效果會隨年齡老化減退。本實驗仍有許多不足之處，在未來研究會繼續進行:

1. 檢測*Elav-Gal4>UAS-UQCRC1-RNAi* 於神經細胞的蛋白質降低量，以及利用螢光染色法與共軛焦顯微鏡檢視大腦中多巴胺神經細胞的數目。

2. 粒線體功能的檢測與粒線體動態平衡的評估，以進一步審視粒線體功能的缺損。

3. 清除異常粒線體的機制包含parkin 蛋白在內，以協助至lysosome的mitophagy 機制，未來將探究mitophagy 相關的變化。

本研究結果顯示細胞自噬對 *UQCRC1* 參與的粒線體功能與神經系統退化的影響，透過對粒線體功能與細胞自噬作用的探討，可以讓我們對於神經細胞退化的機制，有更深一層的認識。盼未來能更進一步的研究此疾病的相關致病機制，對未來以機轉為導向的治療以延緩巴金森氏症的疾病進程提供一些幫助。

捌、 參考文獻

Cerri S, Valente EM. Mitochondria and Parkinson's disease: a complex (III) liaison. Brain. 2020 Dec 5;143(11):3175-3178.

Chicote J, Yuste VJ, Boix J, Ribas J. Cell Death Triggered by the Autophagy Inhibitory Drug 3-Methyladenine in Growing Conditions Proceeds With DNA Damage. Front Pharmacol. 2020 Oct 15;11:580343.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2020 Aug;91(8):795-808.

Lee T, Luo L. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. Trends Neurosci. 2001 May;24(5):251-4.

Lin CH, Tsai PI, Lin HY, Hattori N, Funayama M, Jeon B, Sato K, Abe K, Mukai Y, Takahashi Y, Li Y, Nishioka K, Yoshino H, Daida K, Chen ML, Cheng J, Huang CY,

Tzeng SR, Wu YS, Lai HJ, Tsai HH, Yen RF, Lee NC, Lo WC, Hung YC, Chan CC, Ke YC, Chao CC, Hsieh ST, Farrer M, Wu RM. Mitochondrial UQCRC1 mutations cause autosomal dominant parkinsonism with polyneuropathy. Brain. 2020 Dec 5;143(11):3352-3373.

Sekiya M, Iijima KM. Phenotypic analysis of a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's amyloid-β toxicity. STAR Protoc. 2021 Apr 29;2(2):100501.

Ye H, Robak LA, Yu M, Cykowski M, Shulman JM. Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. Annu Rev Pathol. 2022 Sep 13.

巴金森氏病探索.台灣巴金森之友第十三期/ 二 00 六年一月. 59.

【評語】050015

1. 此研究是以果蠅為模式生物，研究神經退化性疾病的相關分子機制，此研究目標基因為 *UQCRC1*，利用 RNA 干擾技術降低 *UQCRC1* 表現量來建立巴金森氏症模式，再以藥物抑制與促進細胞自噬作用來觀察果蠅運動能力與相關蛋白質表現量方式推論，研究對人類疾病學非常重要。

2. 本模式是台大及中國醫已經建立的技術並發表於 Cell Press，研究方法完全未提及該團隊，試驗也未將如何建立說明，基於研究倫理應有參考資料。

3. 研究中應用許多複雜分生技術，但材料與方法非常不完整，許多技術方法皆未說明，缺少統計分析方法，這些技術也都缺少參考資料。文獻探討應更深入說明前人的發現及使用的研究方法，帶出本研究的新穎性。

4. 此研究建立果蠅的 RNA 干擾降低 *UQCRC1* 表現量方式，先決條件為此基因為和人類 *UQCRC1* 基因為同源基因，而人類巴金森氏症的基因缺失，除 *UQCRC1* 缺失外仍有其他基因缺陷造成，此部分宜思考。