

國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

*PPP2R2B* 基因與臺灣失智症患者的  
遺傳及外遺傳研究

Genetic and epigenetic studies of the  
*PPP2R2B* gene in Taiwanese patients  
with dementia

研究生：李昇翰

Shen-Hung Lee

指導教授：李桂楨 博士

Guey-Jen Lee-Chen

中華民國九十七年七月

# 目錄

目錄.....	I
中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
圖表次.....	VII
壹、緒論.....	1
一、失智症 (Dementia).....	1
(一) 阿茲海默氏症 (Alzheimer's Disease).....	2
(二) 血管性失智症 (Vascular dementia).....	5
二、去磷酸酶 PP2A 與 <i>PPP2R2B</i> 基因.....	6
三、調控基因表現的機制與阿茲海默氏症.....	9
貳、研究目的.....	14
參、研究材料與方法.....	15
一、分析 <i>PPP2R2B</i> 基因啓動子及 5' 端區域的外遺傳調控與阿茲 海默氏症的相關性.....	15
(一) 研究樣品.....	15
(二) 淋巴細胞株 (lymphoblastoid cell line) 的培養及保存.....	15
(三) 基因組 DNA 萃取.....	16
(四) CpG 島甲基化分析.....	17

1、搜尋 <i>PPP2R2B</i> 基因啓動子及 5' 端區域的 CpG 島.....	17
2、Restriction enzyme based-methylation assay (RE-PCR).....	17
3、Bisulfite sequencing assay.....	18
(五) 組蛋白的修飾分析.....	19
1、樣品備製.....	19
2、染色質免疫沈澱 (chromatin immunoprecipitation).....	19
3、聚合酶鏈鎖反應 ( Polymerase Chain Reaction ).....	20
(六) <i>PPP2R2B</i> 基因表現量與阿茲海默氏症的關聯性.....	21
1、淋巴細胞株 RNA 的萃取.....	21
2、cDNA 的製備.....	21
3、即時定量 PCR (Real-time PCR).....	22
二、分析 B $\beta$ 1 基因啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症 之感受性.....	22
(一) 研究樣品.....	22
(二) B $\beta$ 1 啓動子定序.....	23
(三) 聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多型性 (PCR-RFLP) 分 析.....	23
(四) 單股構型多型性 (SSCP) 分析.....	24
(五) 統計分析.....	24

三、擴大建立 B $\beta$ 1 啓動子 CAG 重複序列之遺傳資料庫.....	25
(一) 研究樣品.....	25
(二) 基因型分析 (genotyping).....	25
肆、結果.....	27
一、阿茲海默氏症的外遺傳研究.....	27
(一) CpG 島甲基化分析.....	27
(二) Restriction enzyme based-methylation assay.....	27
(三) Bisulfite sequencing assay.....	29
(四) Chromatin immunoprecipitation assay.....	30
(五) <i>PPP2R2B</i> 基因表現量與阿茲海默氏症的關聯性.....	31
二、阿茲海默氏症與血管性失智症的 B $\beta$ 1 基因啓動子多型性分析.....	31
(一) B $\beta$ 1 基因啓動子定序.....	31
(二) 啓動子多型性的 PCR-RFLP 檢測.....	32
(三) 啓動子多型性的 SSCP 檢測.....	34
(四) 正常人族群 B $\beta$ 1 啓動子多型性的哈溫平衡檢測.....	34
(五) 多型性位點間的聯鎖不平衡檢測.....	35
(六) 啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症感受性的相關性.....	35

三、B $\beta$ 1 啓動子 CAG 三核苷酸重複之遺傳資料庫擴充.....	36
伍、討論.....	38
一、阿茲海默氏症的外遺傳研究.....	38
(一) B $\beta$ 1 啓動子區域 DNA 甲基化程度.....	38
(二) <i>PPP2R2B</i> 啓動子區域的染色質結構.....	39
(三) <i>PPP2R2B</i> mRNA 的表現量.....	41
(四) DNA 甲基化、組蛋白修飾與基因表現.....	41
二、B $\beta$ 1 基因啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症感受 性的相關性.....	42
三、臺灣地區 B $\beta$ 1 基因啓動子 CAG 三核苷酸重覆之遺傳資料 庫.....	43
陸、參考文獻.....	46

## 摘要

PPP2R2B (B $\beta$ ) 為廣泛表現在腦部的去磷酸酶 PP2A 的調控次單位。*PPP2R2B* 基因啓動子的差異使用及選擇性裁接，產生 B $\beta$ 1 及 B $\beta$ 2 兩種異構型。B $\beta$ 1 異構型基因 5' 端的 CAG 重複擴增會使 B $\beta$ 1 的表現量增加，而導致第十二型脊髓小腦運動失調症。反之，本實驗室先前研究成果顯示，罕見短的 (CAG)<sub>5-7</sub> 等位基因和低轉錄活性及阿茲海默氏症相關。此外，外遺傳調控及功能性單一鹼基多型性等因子亦可能影響 B $\beta$ 1 的表現量。為檢視 B $\beta$ 1 基因 5' 端的外遺傳變化，我們以阿茲海默氏症病患及正常人的血液或淋巴細胞株 DNA 為材料，利用限制酶為基礎的甲基化試驗及 bisulfite 定序，來評估 CpG 島的甲基化程度，並利用染色質沉澱-聚合酶鏈鎖反應試驗，來評估染色質結構。結果發現阿茲海默氏症患者的 DNA 甲基化程度及組蛋白 dimethyl H3-K9 比值的增加，顯示外遺傳的變化可能改變阿茲海默氏症患者的 B $\beta$ 1 基因表現。在阿茲海默氏症與正常人族群的病例-對照組分析方面，我們檢測了 6 個 B $\beta$ 1 異構型基因啓動子上的單一鹼基多型性，與阿茲海默氏症、血管性失智症感受性的相關性。結果發現各多型性基因型、等位基因或單套型在患者與正常人族群間沒有顯著差異。最後本論文延續先前研究，擴大 B $\beta$ 1 異構型基因 CAG 三核苷酸重複的遺傳資料庫。雖然並未發現擴增的等位基因，但於二位舞蹈症患者中，觀察到罕見短的 (CAG)<sub>4</sub> 與 (CAG)<sub>6</sub> 等位基因，顯示此低轉錄活性的罕見短的等位基因可能與國人的舞蹈症相關。

## Abstract

PPP2R2B (B $\beta$ ) is an important regulator of protein phosphatase 2A activity in the brain. Through differential promoter usage and alternative splicing, two major isoforms B $\beta$ 1 and B $\beta$ 2 are produced. Increased expression of the abundant B $\beta$ 1 isoform due to CAG repeat expansion causes autosomal dominant spinocerebellar ataxia type 12. Contrarily, our case-control study and reporter assay indicated that the rare short 5~7 triplet alleles are associated with decreased transcriptional activity and Alzheimer's disease (AD). In addition to the CAG repeat variation on B $\beta$ 1 expression, the epigenetic change and functional single nucleotide polymorphisms may also alter the B $\beta$ 1 expression. To examine this, restriction enzyme based-methylation assay and bisulfite sequencing were used to assess the CpG methylation and ChIP-PCR assay to assess the chromatin structure using lymphocyte or lymphoblastoid DNA from AD patients and controls. The results of increased DNA methylation and dimethyl H3-K9 ratio in the 5' region of B $\beta$ 1 gene suggest that the epigenetic change may alter the B $\beta$ 1 expression in AD patients. In addition, a case-control study was conducted to investigate the association of six B $\beta$ 1 promoter single nucleotide polymorphisms (SNPs) with the risk of AD or vascular dementia. No significant difference in genotype, allele and haplotype frequency distribution between cases and controls was observed. Finally, we screened the B $\beta$ 1 CAG repeats distribution in normal controls and in patients with various neurodegenerative diseases. No expanded allele was found in either group. However, the rare short (CAG)<sub>4</sub> and (CAG)<sub>6</sub> alleles were observed in two patients with chorea. As rare short triplet alleles give rise to a significant decrease in the expression level, the results suggest the involvement of rare short triplet alleles with chorea.

## 圖表次

圖一、 <i>PPP2R2B</i> 基因的結構與其所表現的轉錄體和蛋白質.....	58
圖二、 $B\beta 1$ 、 $B\beta 2$ 啓動子及 5' 端外顯子區域的 CpG 島預測分析.....	59
圖三、白血球 DNA 的 $B\beta 1$ 5' 端區域的 RE-PCR 甲基化檢測分析.....	60
圖四、淋巴細胞株 DNA 的 $B\beta 1$ 5' 端區域的 RE-PCR 甲基化檢測分析.....	61
圖五、N5 正常人淋巴細胞株 DNA 的 $B\beta 1$ 5' 端區域的 Bisulfite sequencing 甲基化檢測分析.....	62
圖六、P3 阿茲海默氏症患者淋巴細胞株 DNA 的 $B\beta 1$ 5' 端區域的 Bisulfite sequencing 甲基化檢測分析.....	63
圖七、6 組配對的阿茲海默氏症患者與正常人淋巴細胞株之甲基化程度量化圖.....	64
圖八、淋巴細胞株 DNA 的 CHIP-PCR 檢測.....	65
圖九、Real time RT-PCR 檢測淋巴細胞株中 <i>PPP2R2B</i> 、 <i>HPRT</i> mRNA 的表現量.....	66
圖十、 $B\beta 1$ 基因遠端啓動子多型性的定序圖.....	67

圖十一、B $\beta$ 1 啓動子多型性檢測.....	68
圖十二、B $\beta$ 1 啓動子 -2737 G/A 與 -437 A/G 多型性的 SSCP 分 析.....	69
圖十三、B $\beta$ 1 基因啓動子之 CAG 三核苷酸重複次數的等位基因頻 率分佈圖.....	70
圖十四、B $\beta$ 1 基因啓動子之 CAG 三核苷酸重複次數多型性基因型 分佈圖.....	71
圖十五、二位舞蹈症患者 B $\beta$ 1 基因啓動子之 (CAG) <sub>4</sub> 、(CAG) <sub>6</sub> 等位 基因的 DNA 定序圖.....	72
表一、RE-PCR、ChIP-PCR 和 Bisulfite sequencing PCR 之引子對及 反應條件.....	73
表二、B $\beta$ 1 啓動子定序之引子對及反應條件.....	74
表三、增幅 B $\beta$ 1 啓動子多型性片段所用引子對及反應條件.....	75
表四、正常人族群 B $\beta$ 1 啓動子多型性之哈溫平衡檢測.....	76
表五、B $\beta$ 1 啓動子多型性的 SNPSpD 連鎖不平衡檢測.....	77
表六、阿茲海默氏症患者、血管性失智症患者及正常人族群 B $\beta$ 1 啓 動子多型性的基因型分佈.....	78
表七、阿茲海默氏症患者、血管性失智症患者及正常人族群 B $\beta$ 1 啓 動子多型性的等位基因頻率.....	79

表八、阿茲海默氏症患者、血管性失智症患者及正常人族群 B $\beta$ 1 啓 動子的多型性單套型頻率.....	80
表九、B $\beta$ 1 基因 CAG 三核苷重複等位基因的頻率分佈.....	81

# 壹、緒論

## 一、失智症 (Dementia)

失智症 (英 Dementia、德 Demenz)，Dementia 一字源自拉丁語 *demens* (*de-*意指"遠離" + *mens* 意指"心智")，俗稱癡呆症。失智症並非指稱單一疾病，而是以記憶力、定向力、判斷力、計算力、抽象思考力、注意力、語言等認知功能之障礙的症狀群，同時，也可能出現干擾行為、個性改變、妄想或幻覺等症狀，這些症狀的嚴重程度足以影響人際關係及工作能力。失智症可簡單區分為三類：第一類為退化性失智症，最常見的類型為阿茲海默氏症 (Alzheimer's Disease，簡稱 AD)、額顳葉型失智症 (Frontotemporal lobe degeneration) 以及路易氏體失智症 (Dementia with Lewy Bodies)；第二類則為血管性失智症 (Vascular dementia，簡稱 VaD)；而其他原因如腦瘤、腦炎、愛滋病、外傷、酒癮、水腦、Vitamin B12 缺乏、甲狀腺功能低下等所引發的失智症則歸於第三類。

臺灣失智症族群好發於 65 歲以上的老人，盛行率為 2 ~ 4%，且約半數的患者是罹患阿茲海默氏症，血管性失智症則佔全部病患的四分之一，而約 10% 患者為上述兩者之綜合症狀。儘管阿茲海默氏症與血管性失智症均會導致患者失智，然兩者的發病歷程、病理徵狀

與致病因素等皆不盡相同。

### (一) 阿茲海默氏症

阿茲海默氏症為一漸進式的神經退化性疾病，此症最早由德國的科學家愛羅斯·阿茲海默 (Alois Alzheimer) 於 1907 年提出，因此命名為阿茲海默氏症。病程發展為緩慢且持續性的惡化，症狀發生後就無法恢復。病患症狀包括記憶力喪失、語言溝通障礙、時間及空間定向力異常、人格特質改變、情緒及行為改變等。病理的徵狀包括腦部血管大量堆積老化斑 (senile plaques) 與由神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles) 所導致的神經細胞死亡 (Goedert, 1993)。

老化斑主要成分為  $\beta$  型類澱粉蛋白 ( $\beta$  amyloid protein, 簡稱 A $\beta$ )，約有 40 ~ 42 個胺基酸 (Iwatsubo *et al.*, 1994)，此蛋白由其前驅蛋白 (amyloid precursor protein, 簡稱 APP) 修飾而來。參與 APP 蛋白修飾的酵素主要有三型，分別為  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  切位酶 (secretase)。  
正常人體內的 APP 蛋白會經過  $\alpha$  切位酶 (Anderson *et al.*, 1991) 和  $\gamma$  切位酶 (Seubert *et al.*, 1992) 作用，形成可溶性的蛋白，不會在人體內堆積；然而 APP 蛋白以  $\beta$  切位酶 (Haass *et al.*, 1992) 與  $\gamma$  切位酶修飾，則會形成不可溶的  $\beta$  amyloid 蛋白，於細胞內外堆積而形成包涵體 (Inclusion body)。

神經纖維的糾結與微管相關蛋白 (microtubule associated protein, 簡稱 MAP) tau 有關 (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a, 1986b; Iqbal *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1991)。Tau 能與管蛋白 (tubulin) 結合形成微管，並維持其穩定性 (Weingarten *et al.*, 1975)，但是 tau 蛋白的過度磷酸化反而會降低其維持微管穩定性的功能，且異常的 tau 蛋白本身亦會形成配對的螺旋絲狀體 (paired helical filament)，導致神經細胞骨架的崩解，進而造成神經纖維的糾結 (Gotz, 2001)。Tau 蛋白的磷酸化是由許多激酶 (kinases) 和去磷酸酶 (phosphatase) 所調控，參與 tau 蛋白磷酸化的激酶包括 calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (Xiao *et al.*, 1996)、cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) (Jicha *et al.*, 1999)、glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (Yamaguchi *et al.*, 1996; Pei *et al.*, 1997, 1999; Ferrer *et al.*, 2001) 和 cyclin-dependent protein kinase 5 (cdk5) (Pei *et al.*, 1998)；負責調控 tau 蛋白去磷酸化的酵素則包括 protein phosphatase 2A (PP2A)、protein phosphatase 2B (PP2B)、protein phosphatase 1 (PP1) 和 protein phosphatase 5 (PP5) 等去磷酸酶，其中 PP2A 與 tau 的過度磷酸化關聯性最強 (Liu *et al.*, 2005)。

引起阿茲海默氏症的確切病因尚不清楚，但不少研究指出年齡是最為明顯的關鍵因子，65 歲以上的老人，每增加 5 歲，阿茲海默氏

症的發生率就會增加 1 倍。以 65 歲做分水嶺，可將阿茲海默氏症區分為早發性（小於 65 歲）和晚發性（大於 65 歲）二種，早發性的患者通常具有家族遺傳史，在家族遺傳的早發性阿茲海默氏症患者中，位於第二十一號染色體上的 APP 蛋白編碼基因 *APP* 之序列上的點突變 (Goate *et al.*, 1991)，使  $\beta$  切位酶易於作用而切割成不溶的  $\beta$  amyloid 蛋白 (Mullan *et al.*, 1992)。唐氏症的病患因為第二十一號染色體比正常人多一條，導致 *APP* 基因的過量表現，造成  $\beta$  amyloid 蛋白堆疊而導致阿茲海默氏症 (Ringman *et al.*, 2008)。在早發性的家族遺傳患者中，第十四號染色體上的 *presenilin-1* 基因 (*PS-1*) (Schellenberg *et al.*, 1992) 以及第一號染色體上的 *presenilin-2* 基因 (*PS-2*) (Levy-Lahad *et al.*, 1995) 上發現突變點，不過此兩個基因功能並不十分清楚，推測與神經分化 (Capell *et al.*, 1997) 和軸突的生長有關 (Dowjat *et al.*, 1999)。晚發性的患者則大都為偶發性，阿茲海默氏症的患者中 90% 以上屬之，而位於第十九號染色體的 apolipoprotein E (*ApoE*) 基因與此型阿茲海默氏症相關，apolipoprotein E 的功能原為調節大腦中脂質的代謝，但 Namba 等人指出阿茲海默氏症患者的老化斑內亦發見 apolipoprotein E 的存在 (Namba *et al.*, 1991)，後續研究更進一步發現，*ApoE* 基因之  $\epsilon 4$  等位基因會提高阿茲海默氏症的罹患率 (Corder *et al.*, 1993)。

除了年齡、遺傳因素之外，阿茲海默氏症與環境因子亦有相關，酗酒、抽菸、低教育水準、頭部外傷、甲狀腺機能減退等因素，皆可能增加阿茲海默氏症的罹患率。不過上述的研究成果並不能解釋所有的病例，顯示還有其他的基因或遺傳因子參與阿茲海默氏症的病發。

## (二) 血管性失智症

血管性失智症與阿茲海默氏症同為失智方面的疾病，但其發病歷程、病裡徵狀和致病原因卻不盡相同。血管性失智症的定義為患者因心血管疾病，引發腦血管梗塞（腦中風）或破裂（腦溢血），導致腦部功能受損害，進而引發失智的症狀。血管性失智症患者的症狀包括運動緩慢、執行功能缺失、視覺建構異常，及其餘較不顯著的功能如語言和計算能力喪失等 (Desmond, 1996)。此外，血管性失智症患者在執行功能上的缺失較阿茲海默氏患者低落 (Looi and Sachdev, 1999)，但是在新語言的學習表現與阿茲海默氏患者無異 (Cummings, 1994)。血管性失智症的病程為階梯型發展，即中風每發作一次，失智症狀即加重一次，但少數個案中，中風症狀的緩解可恢復部分的智力。病理的徵狀主要為中風的病灶所引發的腦血管破裂或梗塞。

血管性失智症的導因可能由環境與遺傳因素共同調控，腦中風為此症最重要的危險因子，因此影響中風的因素如高血壓、心臟血管

病、糖尿病、高血脂、抽煙等都會增加疾病的罹患率。近年來，基因與分子遺傳學的研究提供此症潛在的相關致病因子，如有研究報導調節膽固醇代謝基因 sterol regulatory element binding protein-2 (*SREBF2*) 的多型性 (polymorphism) 與血管性失智症的罹患率相關 (Kim *et al.*, 2005)；調控血壓的基因 angiotensinogen (*AGT*) 的多型性現象亦會影響血管性失智症的罹患率 (Kim *et al.*, 2006)；免疫相關基因 transforming growth factor- $\beta$ 1 (*TGF- $\beta$ 1*) 的變異會改變血管性失智症的感受性 (Kim and Lee, 2006)；*ApoE*  $\epsilon$ 4 等位基因雖是晚發性阿茲海默氏症的危險因子，但與血管性失智症並無太大關聯 (Sulkava *et al.*, 1996)。然截至目前的研究證據仍不足以解釋所有血管性失智症，尚有許多未發現的致病因子潛藏其中。

## 二、去磷酸酶 *PP2A* 與 *PPP2R2B* 基因

可逆的蛋白磷酸化是調節細胞內生理活動的機轉，而負責調控蛋白磷酸化的酵素可區分為兩大類，其一是增加蛋白磷酸化程度的激酶 (kinase)，另一類則為降低蛋白磷酸化的去磷酸酶 (protein phosphatase，簡稱 PPase)。在蛋白去磷酸酶的家族群中，最重要的四個成員分別為去磷酸酶 1 (protein phosphatase 1，簡稱 PP1)、去磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A，簡稱 PP2A)、去磷酸酶 2B (protein

phosphatase 2B，簡稱 PP2B)、去磷酸酶 2C (protein phosphatase 2C，簡稱 PP2C)，其中 PP2A 為真核生物體內，普遍表現的一種絲胺酸/蘇胺酸去磷酸酶 (serine/threonine protein phosphatase)。

PP2A 為多種生理機能的調控因子，包括細胞生長、分化、細胞質分裂、細胞型態、離子孔道、神經傳導物的釋放、去氧核糖核酸的複製和細胞凋亡等 (Santoro *et al.*, 1998; Price and Mundy, 1999; Virshup, 2000)，在神經細胞生長與發育層面，PP2A 能協助維持神經纖維的穩定，亦能調節神經纖維中細胞骨架相關分子間的交互作用。以微管相關蛋白為例，PP2A 能調節 tau 蛋白的磷酸化程度，維持微管結構的穩定 (Janssens and Goris, 2001)，而 tau 蛋白過度磷酸化所引發的神經纖維糾結為阿茲海默氏症之病理徵狀，顯示 PP2A 可能與阿茲海默氏症間存在一定關聯性，Gong 等人研究成果顯示，阿茲海默氏症患者大腦中的 PP2A 活性低於正常人 (Gong *et al.*, 1995)，亦為上述假說提供一有力證據。

PP2A 的結構由 A、B、C 三個次單位所組成，A 次單位 (65 kDa) 結構骨架，會與具催化功能的 C 次單位結合 (36 kDa)，再進一步與調節次單位 B 組成全酶，進行酵素功能的執行與調節。哺乳類中，A、C 次單位分別具有  $\alpha$ 、 $\beta$  兩種異構型 (isoform)，但兩型序列保守性高，且普遍地表現在全身細胞和組織，而 B 次單位則可細分為

四個家族 (B、B'、B''、B''') 等共 17 型，各型間之序列保守性較低，由於此序列之差異，故在個體中約可形成 75 種以上不同型式的 PP2A 全酶 (Janssens and Goris, 2001)，且此多樣性的 B 次單位具有組織特異性，會專一性表現在不同的細胞和組織。此外，B 次單位能調控 PP2A 全酶與不同受質間的親和力，進而影響去磷酸酶的催化活性 (Strack *et al.*, 1998; Virshup, 2000; Dagda *et al.*, 2003)。

B 次單位的 B 家族包含 PR55 $\alpha$ 、PR55 $\beta$ 、PR55 $\gamma$ 、PR55 $\delta$ ，大小約 55 kDa，PR55 $\beta$  (也稱 B $\beta$ ) 專一性表現於大腦組織中 (Mayer *et al.*, 1991)，調節 PP2A 全酶對中間絲蛋白 (vimentin) (Turowski *et al.*, 1999) 與 tau 蛋白 (Sontag *et al.*, 1996) 等受質的去磷酸化，故在神經纖維穩定度的維持層面，B $\beta$  與 PP2A 可能扮演重要的角色。B $\beta$  編碼基因 *PPP2R2B* 位於第五號染色體，藉由啓動子差異使用及選擇性裁接 (alternative splicing)，產生 N 端相異的 B $\beta$ 1 及 B $\beta$ 2 兩種異構型 (圖一)，分別表現於細胞質與粒線體中，但兩種異構型並不影響 PP2A 全酶對其受質的去磷酸化能力 (Dagda *et al.*, 2003)。

*PPP2R2B* 基因的變異會影響細胞的功能，酵母菌的 *PPP2R2B* 同源基因 *CDC55* 若發生突變，會影響酵母菌的細胞分裂 (Healy *et al.*, 1991)；而在果蠅系統中，*PPP2R2B* 同源基因 *twins* 的突變株會造成有絲分裂的缺陷及神經發育的異常 (Shiomi *et al.*, 1994)。此外

*PPP2R2B* 基因變異亦會造成神經退化性疾病，如  $\beta$ 1 啓動子區域 CAG 三核苷酸重複序列發生擴增 ( $CAG_{>65}$ )，會造成第十二型脊髓小腦萎縮症 (spinocerebellar ataxia 12，簡稱 SCA12) (Holmes *et al.*, 1999)。以哺乳類神經細胞作為實驗材料的研究發現，抑制 PP2A 的活性，會造成類似阿茲海默氏症症狀的過度磷酸化的 tau 蛋白堆積 (Gong *et al.*, 2000)。

### 三、調控基因表現的機制與阿茲海默氏症

基因表現主要受到遺傳 (genetic) 與外遺傳 (epigenetic) 二大層面的調控。*PPP2R2B* 基因遺傳層面的調節包括 CAG 三核苷酸重複擴增、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism，簡稱 SNP) 等基因序列上的變異，而 DNA 甲基化 (methylation) 與組蛋白 (histone) 的修飾則歸屬於外遺傳調控。

Holmes 等人研究結果顯示  $\beta$ 1 啓動子區域的 CAG 三核苷酸重複擴增現象與第十二型脊髓小腦萎縮症相關 (Holmes *et al.*, 1999)，Holmes 等人更進一步推測，該區域的 CAG 三核苷酸重複擴增現象，導致  $\beta$ 1 表現量上升，增加去磷酸酶 PP2A 的活性，影響其受質的磷酸化程度，造成神經細胞的功能喪失和死亡 (Holmes *et al.*, 2003)。本實驗室先前於臺灣地區多種神經退化性疾病的研究，雖

未發現 CAG 三核苷酸重複擴增現象，但發現轉錄活性低之罕見短的 CAG 三核苷酸重複序列 (CAG<sub>5-7</sub>)，可能與阿茲海默氏症相關 (Chen *et al.*, 2008)。推測較短的 CAG 三核苷酸重複序列，可能會減少 B $\beta$ 1 的表現量，進而降低去磷酸酶 PP2A 的活性，導致 tau 蛋白的過度磷酸化，最終造成阿茲海默氏症的病徵。

啓動子區域 SNP 點的變異，爲另一個影響基因表現的遺傳因子。*ApoE* 爲阿茲海默氏症危險因子之一，其啓動子具有三個 SNP 點，分別爲 -491 A/T、-427 T/C、-219 T/G，其中 -491 A/T 與 -219 T/G 的變異會影響 *ApoE* 啓動子的活性，-427 T/C 的變異則否 (Artiga *et al.*, 1998a)。-419A 等位基因與 -427C 等位基因所形成的單套型 (haplotype) (-419A/-427C)，會增強 *ApoE* 啓動子的活性，同時亦會提高罹患阿茲海默氏症的風險 (Artiga *et al.*, 1998)。在阿茲海默氏症的另一個危險因子 *APP* 的研究中亦有類似結果，華人族群中，*APP* 啓動子區域存在三個 SNP 點，分別爲 -955 A/G、-877 T/C、-9 G/C，前兩者具有很強的連鎖關係，單套型 (-955A/-877T) 的啓動子活性爲 (-955G/-877C) 的四倍，且在阿茲海默氏症的族群中出現的頻率較高，顯示此 (-955A/-877T) 單套型可能會增加 *APP* 的表現量，進而提高阿茲海默氏症的罹患率 (Lv *et al.*, 2008)。

屬於外遺傳調控的 DNA 甲基化與組蛋白的修飾 (甲基化/乙醯化 acetylation) 均會調節基因的表現 (Bird, 2002)。大量的研究顯示 DNA 甲基化能關閉基因的表現，而去甲基化則能誘導基因的重新表達 (Cedar, 1988)。DNA 甲基化主要會引起染色質結構、DNA 構型、與 DNA 和蛋白質間交互作用的改變，進而抑制轉錄因子與啓動子結合的效率，而降低轉錄活性。在 DNA 序列中，相鄰的 CG 雙核苷酸的 C 鹼基，爲甲基化作用的位置，富含 CG 雙核苷酸的 DNA 序列稱爲 CpG 島 (CpG island)，在整個基因組中，CpG 島爲最易發現 DNA 甲基化的區域。

甲基化的 C 鹼基除直接隔離 DNA 與轉錄因子 (transcriptional factor) 等蛋白外，亦能與甲基化結合蛋白 (methyl binding proteins，簡稱 MBDs) 結合，進一步吸引組蛋白去乙醯酶 (histone deacetylase，簡稱 HDAC) 前來，導致組蛋白去乙醯化，而形成較緊密的染色質結構，讓轉錄因子不易與轉錄活化位的啓動子結合，使得轉錄作用無法執行，而降低基因的表現 (Wu *et al.*, 2008)。DNA 甲基化的關鍵酵素爲 DNA 甲基轉移酶 (DNA-methyltransferase，簡稱 DNMT)，而甲基的提供者則來自 S-腺苷甲硫氨酸/同型半胱氨酸循環 (S-adenosylmethionine/ homocysteine cycle)，若此二者若發生變異則會導致 DNA 甲基化異常 (Scarpa *et al.*, 2006)。

DNA 甲基化的研究集中在細胞老化歷程與癌症生成的相關角色上，而近年的研究顯示，基因啓動子上甲基化的程度可能與阿滋海默氏症相關，以第十四號染色體的 *presenilin-1* 基因 (*PS-1*) 爲例，除 DNA 序列的點突變會導致  $\beta$ -amyloid 蛋白累積外，其基因啓動子活性亦受 DNA 甲基化的影響。Scarpa 等人在人類的神經母細胞瘤細胞株 (SK-N-SH) 的研究報告中證實，*PS-1* 啓動子的去甲基化作用，會引發 *PS-1* 蛋白大量表現，進而造成  $\beta$ -amyloid 蛋白的堆積 (Scarpa *et al.*, 2003)。Fuso 等人於另一細胞株 SK-N-BE 的試驗中，亦獲得相似結果 (Fuso *et al.*, 2005)。而學者更進一步指出，若缺乏葉酸 (folate) 與維生素 B12 (vitamin B12) 則會破壞 S-腺苷甲硫氨酸/同型半胱氨酸循環，因而降低 *PS-1* 基因啓動子區域的甲基化，促使 *PS-1* 基因表現量上升，增加  $\beta$ -amyloid 蛋白的堆疊。然若以 S-腺苷甲硫氨酸處理，即可恢復 *PS-1* 正常的表現量，減緩  $A\beta$  沈澱的形成。顯示 *PS-1* 基因的表現確實受其啓動子區域甲基化程度的調節。此外 Mani 與 Thakur 在小鼠爲動物模式的研究中發現，雌性個體 *APP* 啓動子的甲基化程度大於雄性，且證實 *APP* 啓動子的甲基化程度確實受到性荷爾蒙誘導而增加 (Mani and Thakur, 2006)，推測由性荷爾蒙所引發的轉錄活性低落，會進一步減少  $\beta$ -amyloid 蛋白形成與堆積，顯示在阿茲海默氏症的致病機轉中，DNA 甲基化亦扮演重

要的角色。

組蛋白 H1、H2A、H2B、H3、H4 的修飾為另一種外遺傳調控，主要藉由調節染色質絲的結構鬆散來影響基因表現。目前已知的組蛋白修飾包括乙醯化、磷酸化 (phosphorylation)、甲基化、ADP 核糖基化 (ADP ribosylation) 與泛素化 (ubiquitination) 等 (Cheung *et al.*, 2000)。在轉錄活躍的染色質區域，組蛋白 H3 的第四號殘基-離胺酸 (lysine) 具高度甲基化與乙醯化現象，能降低核小體與 DNA 間的親和力，而九號殘基-離胺酸的甲基化則涉及基因沉默現象。若在轉錄相對不活化的染色質區域，組蛋白修飾圖譜則相反。組蛋白 H1 並非構成核小體的核心蛋白，而是加強 DNA 與核小體的連結，Mori 等人在阿茲海默氏症患者大腦內發現，組蛋白 H1 過度磷酸化而致使 PP2A 高度表現 (Mori *et al.*, 2003)，顯示組蛋白修飾亦與阿滋海默氏症的致病機轉相關。

## 貳、研究目的

截至目前為止影響阿茲海默氏症與血管性失智症的確切原因尚未釐清，而先前本實驗室的研究發現，*PPP2R2B* 基因可能參與阿茲海默氏症的病程，位於  $B\beta 1$  啟動子區域中較短的 CAG 三核苷酸重複 ( $CAG_{5\sim 7}$ )，會降低  $B\beta 1$  基因的轉錄活性，進一步可能影響 PP2A 的活性和 tau 蛋白的磷酸化程度，而增加阿茲海默氏症的感受性。本研究延續之前的實驗成果，繼續擴大建立臺灣正常族群、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、原發性顫抖症 (essential tremor)、舞蹈症 (chorea) 及肌張力異常症 (dystonia) 等其他神經疾病患者的 CAG 三核苷酸重複次數的遺傳資料庫，以提供臨床診斷諮詢的參考，並尋找更多較短的 CAG 三核苷酸重複與  $B\beta 1$  表現之相關證據；進而就遺傳 (啟動子片段上的單一鹼基多型性)、外遺傳 (5' 端區域的 DNA 甲基化程度與組蛋白的修飾) 層面分析其他可能影響  $B\beta 1$  表現量之機轉，推測 *PPP2R2B* 與阿茲海默氏症、血管性失智症間的關聯性。

## 參、研究材料與方法

### 一、分析 *PPP2R2B* 基因啓動子及 5' 端區域的外遺傳調控 與阿茲海默氏症的相關性

#### (一) 研究樣品

經診斷判定無精神疾病或神經退化性疾病的正常人 (20 位) 及阿茲海默氏症患者 (20 位) 的DNA樣品及 6 組年齡、性別配對的正常人與阿茲海默氏症患者的淋巴細胞株，由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師、徐文俊醫師提供，血液樣品之採集皆經由本人或是家屬同意。

#### (二) 淋巴細胞株 (lymphoblastoid cell line) 的培養及保存

6 組年齡、性別配對的正常人與阿茲海默氏症患者的淋巴細胞株培養於 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 且濕度良好的培養箱中，培養液為含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青黴素 (penicillin)、100 µg/mL 鏈黴素 (streptomycin) 及含有 1% L-glutamine 之 RPMI1640 (Gibco)。每隔 48 ~ 72 小時添加 5 或 10 mL 培養液於培養瓶中，待培養至一定體積後 (60 mL)，離心 1000 rpm 5 分鐘，去上清液後再更換至新的培養瓶，繼代培養。冰凍保存細胞時，將細胞以 1000 rpm 5 分鐘離心

收集，去上清液並加入含 12.5% DMSO 的培養液 1 mL，置於冰上 2 小時、-20°C 2 小時及 -80°C 隔夜培養，再保存於液態氮中。

### (三) 基因組 DNA 的萃取

利用 DNA extraction kit (Stratgene) 萃取基因組 DNA。先取定量 ( $1 \times 10^7$  個) 淋巴細胞培養液置於 50 mL 離心管中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，去上清液後加入 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline)，震盪離心管使細胞重新懸浮，再移入 15 mL 離心管，並以 1000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，重複以上述步驟再次清洗，待去除上清液後，加入 2 mL solution II，震盪使細胞重新懸浮，再加入 10  $\mu$ L proteinase K，將離心管置於 37°C 水浴槽作用 16 ~ 72 小時。自水槽中取出離心管，加入 0.8 mL solution III，置於冰上作用 5 分鐘，以 3500 rpm 離心 15 分鐘，取上清液至新的 15 mL 離心管，加入 5  $\mu$ L RNase 於 37°C 水浴槽作用 15 分鐘，再加入 2.5 mL 異丙醇 (isopropanol) 緩慢搖勻，使懸浮液分上下兩層，將含 DNA 的上層懸浮液轉置於 1.5 mL 微量離心管，以 14000 rpm 離心 1 分鐘使 DNA 沉澱，去除上清液並加入 0.5 mL 75% 酒精清洗，再以 14000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液後置於室溫風乾，再加入適量的 ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA，利用 OD<sub>260</sub> 吸光值檢測 DNA 濃度，最後以

ddH<sub>2</sub>O 稀釋 DNA 濃度為 50 ng/μL，儲存於 4°C 冰箱備用。

#### (四) CpG 島甲基化分析

##### 1、搜尋 *PPP2R2B* 基因啓動子及 5' 端區域的 CpG 島

以線上軟體 CpG Island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/cpg.aspx>) (Takai and Jones, 2003)，分析 *PPP2R2B* 基因兩個異構型 (Bβ1 和 Bβ2) 的啓動子及 5' 端約 3.0 kb 區域，檢查此兩段區域是否有 CpG 島的存在。

##### 2、Restriction enzyme based-methylation assay (RE-PCR)

利用辨識相同序列 (C<sup>↓</sup>CGG) 的限制內切酶 *Hpa*II、*Msp*I，針對 CpG 島甲基化作評估，無論辨識序列中的 CpG 上甲基化與否，*Msp*I 均能切割，而 *Hpa*II 則無法有效切割甲基化的辨識序列。實驗組 DNA 樣品分別使用此兩種酵素，而對照組 (-) 則以酵素反應緩衝液處理。

以上述三種實驗處理的 DNA 為模板，利用針對 Bβ1 基因外顯子 1.1 區域所設計的專一性引子對 (表一)，放大該區域的 DNA 片段。PCR 的產物以 1.4% 洋菜膠體進行 150 V、20 分鐘電泳，再透過 Alphamager 1200 影像系統作相對定量分析，以 *Msp*I 切割為模板的 PCR 產物作為背景值，將以 *Hpa*II 切割為模板的 PCR 產物

量，及以未添加酵素切割為模板的 PCR 產物量，分別減去背景值後，計算其比值，以推知該樣品於此區域的甲基化程度。

### 3、Bisulfite sequencing assay

使用 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (ZYMO) 進行本實驗，其實驗流程入如下：取一管 CT Conversion Reagent，加入 900  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O、50  $\mu\text{L}$  M-Dissolving Buffer 與 300  $\mu\text{L}$  M-Dilution Buffer，均勻混合 10 分鐘，形成 CT Conversion Reagent 溶液。取 130  $\mu\text{L}$  CT Conversion Reagent，加入 20  $\mu\text{L}$  DNA 樣本（濃度為 50 ng/ $\mu\text{L}$ ），將混合液置於 98°C 10 分鐘後，再移到 64°C 反應 2.5 小時，反應完成後加入 600  $\mu\text{L}$  M-Binding Buffer 並均勻混合，以 13000 rpm 快速離心 30 秒後去除上清液，加入 100  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 清洗並去除上清液，再加入 200  $\mu\text{L}$  M-Desulphonation，置於室溫反應 20 分鐘後，快速離心去除上清液，加入 200  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 清洗兩次後，加入 10  $\mu\text{L}$  M-Elution Buffer 後靜置 5 分鐘，以 13000 rpm 快速離心 1 分鐘收集溶液並保存於 -20°C。使用處理過的 DNA 樣本進行 PCR 反應，PCR 反應所使用的引子對與條件如表一，PCR 產物經過限制內切酶確認無誤後，委託源資生物科技股份有限公司進行定序反應。

## (五) 組蛋白的修飾分析

### 1、樣品備製

取定量 ( $1 \times 10^7$  個) 淋巴細胞置於 50 mL 離心管, 加入 5 mL 冰的 PBS 清洗兩次, 去上清液後加入 10 mL 的 PBS 溶液與 270  $\mu$ L、1% 甲醛 (formaldehyde), 置於 37°C 培養箱 10 分鐘, cross-link DNA 與組蛋白。再以內含 protease inhibitor (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstain A) 的 5 mL PBS 清洗兩次, 於 4°C、2000 rpm 離心 4 分鐘後移除上清液, 加入含 protease inhibitor 的 400  $\mu$ L SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.1) 於冰上作用 10 分鐘, 準備進行超音波震盪。

使用 Miceoson<sup>TM</sup> Ultrasonic cell disruptor 進行超音波擊碎 (最大功率 100 W)。將樣品置於冰上放在超音液探針下, 功率 50 ~ 75 W 震盪 30 秒後休息 2 分鐘, 以此循環進行 24 次, 將 DNA 裁切成 200 ~ 2000 bp。震破之後的細胞, 以 4°C、12000 rpm 離心 10 分鐘, 吸取上清液置於新的 2 mL 離心管。

### 2、染色質免疫沈澱 (chromatin immunoprecipitation)

上清液經 OD<sub>260</sub> 定量後分成 A、B、C 三管, A 管作為正控制組, 不進行免疫沉澱, 先保存於 -20°C 冰箱, B、C 兩管則進行下

列免疫沉澱反應。B、C 兩管分別加入含 protease inhibitor 的 1600  $\mu\text{L}$  CHIP dilution buffer，再加入 75  $\mu\text{L}$  protein A-agarose / salmon sperm DNA 後，置於 4°C 冰箱旋轉 1 小時，去除非專一性背景。以 4°C、2000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液置於新的 2 mL 離心管，C 管加入 5  $\mu\text{g}$  抗體 anti dimethyl Histone H3 lysine 9 (代表緊密的染色質結構) 或 anti acetyl Histone H3 lysine 14 (代表鬆散的染色質結構) 作為實驗組，不加抗體的 B 管為負控制組，置於 4°C 冰箱旋轉 16 ~ 24 小時。第二天加入 60  $\mu\text{L}$  protein A-agarose / salmon sperm DNA，置於 4°C 冰箱旋轉 1 小時。以 4°C、2000 rpm、離心 3 分鐘後去除上清液，經緩衝溶液的清洗沉澱物數次後，以 0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 、1% SDS 的溶液溶離出含 DNA 與蛋白質的免疫複合物。將 A 管從 -20°C 冰箱取出，與 B、C 兩管一同加入 8  $\mu\text{l}$  5 M  $\text{NaCl}$ ，於 65°C 水浴 4 小時，分開 cross-link 的 DNA 與蛋白質。每管再加入 2  $\mu\text{L}$  proteinase K 使蛋白分解，最後使用 phenol/chloroform 溶液萃取 DNA，並存於 -20°C。

### 3、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)

以 A、B、C 三管的 DNA 溶液為模板，配合針對  $\text{B}\beta 1$ 、 $\text{B}\beta 2$  啟動子及 5' 端區域所設計的引子 (表一) 進行 PCR 反應。PCR 的產

物以 1.4% 洋菜膠體 150 V、20 分鐘電泳電泳檢查，並利用 Alphamager 1200 影像系統作相對定量，以推知染色質結構的鬆緊。

## (六) *PPP2R2B* 基因表現量與阿茲海默氏症的關聯性

### 1、淋巴細胞株 RNA 的萃取

取定量 ( $1 \times 10^7$  個) 淋巴細胞置於 50 mL 離心管中，加入 TRIZOL 500  $\mu$ L，置冰上作用 5 分鐘。再加入 100  $\mu$ L chloroform 搖勻，於冰上反應 3 分鐘。以 4°C、13000 rpm 離心 15 分鐘，吸取上清液 600  $\mu$ L 至 1.5 mL 離心管。加入 480 ~ 600  $\mu$ L 異丙醇，置於 -20°C、1 小時。4°C、13000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液，以 1 mL 75% 酒精 (in DEPC-ddH<sub>2</sub>O) 清洗沉澱物，4°C、13000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液並風乾。加入適量的 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 溶解 RNA，利用 OD<sub>260</sub> 吸光值檢測 RNA 濃度，並以 0.8% 洋菜膠體 120 V、40 分鐘電泳檢視，存於 -80°C 冰箱備用。

### 2、cDNA 的製備

取 6.25  $\mu$ g RNA 加入 0.5  $\mu$ L Rnase-free DNase，加 ddH<sub>2</sub>O 補至總體積 25  $\mu$ L，置於 37°C 反應 30 分鐘，再置於 65°C、15 分鐘終止反應。接著利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) 進行反轉錄作用，反應條件如下：取 2  $\mu$ g 的

RNA 溶於總體積為 20  $\mu$ L 的反應溶液，置於 25°C 反應 10 分鐘，再以 37°C 作用 120 分鐘，最後 85°C、5 秒以終止反應，並將 cDNA 產物存於 -20°C。

### 3、即時定量 PCR (Real-time PCR)

本研究所使用的 *PPP2R2B* 螢光探針為 Hs00270227\_m1 (TaqMan, Applied Biosystems)，使用 *HuHPRT* 螢光探針 (4326321E, Applied Biosystems) 當內生性對照組。取 200 ng cDNA，加入反應溶液成總體積 25  $\mu$ L，反應則以 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System 儀器進行，並記錄結果 ( $C_T$  值變化)。

## 二、分析 $B\beta 1$ 基因啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症之感受性

### (一) 研究樣品

正常人 (255 位)、阿茲海默氏患者 (238 位) 以及血管性失智症患者 (74 位) 之 DNA 樣品來源如上述。正常人族群的年齡範圍、平均年齡和女性百分比分別為 43 ~ 90、66.3 $\pm$ 9.1、52.9%；阿茲海默氏症患者為 38 ~ 104、75.8 $\pm$ 8.6、62.1%；血管性失智症患者為 53 ~

86、74.5±7.5、50.0%。此部份研究結果是與本實驗室的劉若芸同學共同合作完成 (劉，2006)。

## (二) B $\beta$ 1 啓動子定序

針對 B $\beta$ 1 基因遠端啓動子序列，設計三對專一性的引子對，選擇正常人和血管性失智症患者 DNA 樣品各三個作為模板，進行聚合酶連鎖反應，增幅 -6718 ~ +23 的啓動子片段。PCR 使用的引子對與條件如表二，PCR 產物以 1.0% 洋菜膠體 150 V、20 分鐘電泳檢查，再用限制內切酶確認無誤後，委託源資生物科技股份有限公司進行定序反應。結果共檢測到 -4329 G/A、-3177 C/T、-2930 A/G、-2737 G/A、-1918 T/A、-437 A/G 等多型性點。

## (三) 聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多型性 (PCR-RFLP) 分析

取 100 ng 的樣品 DNA，置於 25  $\mu$ l 的 PCR 反應中，放大包含上述 B $\beta$ 1 啓動子多型性的片段。各多型性點所使用的引子對及 PCR 反應的條件列於 (表三)，PCR 的產物以 1.4% 洋菜膠體電泳 120 V、40 分鐘檢視片段大小。取 2  $\mu$ l PCR 產物，針對各多型性點所設計的限制內切酶 (表三)，與反應緩衝溶液均勻混合，於 37°C 水浴槽中反應 2 ~ 24 小時。以 1.4 ~ 2.2% 洋菜膠體電泳 120 V、40 分鐘檢查片段大小，判別各樣品之基因型。

#### (四) 單股構型多型性 (SSCP) 分析

設計螢光正向引子，分別放大包含 -2737G/A、-437 G/A 多型性的片段。取 3  $\mu$ L 的 PCR 產物與 3.5  $\mu$ L 之 95% formamide 染液均勻混合，置於 95°C 乾浴器作用 5 分鐘，使其 DNA 雙股打開，然後再迅速置於冰上冷卻 5 分鐘，產生單股構形。經樣品快速離心後，取 5  $\mu$ L 的混合液置於 GeneGel Excel 12.5/24 膠片 (Pharmacia Biotech) 中，以 8°C、600 V、25 mA、15 W 進行電泳反應 1.5 小時。待電泳結束後，使用 Typhoon 9410 儀器中波長 488 nm 的藍色螢光進行影樣掃描與擷取。

#### (五) 統計分析

計算阿茲海默氏症、血管性失智症族群與正常人族群各多型性基因型及等位基因頻率，以 chi-square 檢測各多型性點是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)，並檢測病患族群與正常人族群間，是否有顯著差異。此外，配合線上軟體 SNPSpD (<http://genepi.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD/>) (Nyholt, 2004)，分析 B $\beta$ 1 啟動子上各個多型性點間的連鎖不平衡 (linkage disequilibrium，簡稱 LD) 關係，得到調整後第一型統計誤差為 5% 的顯著性閾值，作為判別顯著性的  $\alpha$  值 (本研究的  $\alpha$  值為 0.012)，

並利用 LDMAX 軟體計算出的 Lewontin's 標準化不平衡係數  $D'$ 、 $\Delta^2$  值 (squared pairwise correlations) 與  $\lambda_s$  值 (eigenvalues)，用以判斷各 SNP 間的連鎖強弱關係。最後輔以 PHASE 軟體 (version 2.1) (Stephens *et al.*, 2001)，來預估多型性的單套型頻率。

### 三、擴大建立 B $\beta$ 1 啓動子 CAG 重複序列之遺傳資料庫

#### (一) 研究樣品

經診斷判定無精神疾病或神經退化性疾病的正常人 (60 位)、帕金森氏症 (73 位)、原發性顫抖症 (53 位)、舞蹈症及肌張力異常症等其他疾病和其家屬 (75 位) 的 DNA 樣品，由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師提供，血液樣品之採集皆經由本人或是家屬同意。

#### (二) 基因型分析 (genotyping)

取 100 ng 的基因組 DNA 與專一性的引子對 (5'-tamra-TGCTG-AAAGAGTCGTG、5'-GCCAGCGCACTCACCCCTC) 進行 PCR 反應 (54°C 煉合、1.0 mM MgCl<sub>2</sub>、10% DMSO)，PCR 產物則以洋菜膠體電泳 120 V、40 分鐘確認無誤，取 1  $\mu$ L 的 PCR 產物，以 1:16 比例加水稀釋，並委託國立臺灣師範大學遺傳多樣性實驗室進行基因型

分析，再利用 MegaBACE Genetic profile v.1.5 軟體分析比對其基因型，推算該樣品三核苷酸重複次數。所檢測到的罕見短的重複次數樣本，則進一步以 1.8% 洋菜膠電泳純化 PCR 產物，進行 DNA 定序確認。

## 肆、結果

### 一、阿茲海默氏症的外遺傳研究

#### (一) CpG 島甲基化分析

使用線上軟體 CpG Island searcher，分析 *PPP2R2B* 基因兩個異構型 B $\beta$ 1、B $\beta$ 2 的啓動子及 5' 端約 3 kb 區域，圖二(A) 顯示 B $\beta$ 1 具有兩個 CpG 島，B $\beta$ 2 則無，故選擇 B $\beta$ 1 的 5' 端區域進行 DNA 甲基化的研究。

#### (二) Restriction enzyme based-methylation assay

利用 (C<sup>↓</sup>CGG) 的限制內切酶 *Hpa*II、*Msp*I，針對 20 位正常人及 20 位阿茲海默氏症患者的血液 DNA 樣品 (圖三)，及 6 組年齡與性別配對的正常人與阿茲海默氏症患者的淋巴細胞株 DNA 樣品 (圖四)，進行 CpG 島甲基化評估。各 DNA 樣品均以三種條件處理：未經過酵素切割、*Hpa*II 切割、*Msp*I 切割。如圖三(A)、圖四(A) 所示，未經過酵素切割者有一明顯的 DNA 色帶 (lane -)；由於辨識序列 C<sup>↓</sup>CGG 無論甲基化與否，均能被 *Msp*I 切割，經 *Msp*I 切割後 DNA 而呈 smearing 現象 (lane M)；而 *Hpa*II 僅能切割未甲基化

的辨識序列 C<sup>1</sup>CGG，故經 *HpaII* 切割後的 DNA 片段明顯大於 *MspI* 切割者 (lane H)。

以上述三種實驗條件處理後之基因組 DNA 作為模版，利用辨認 B $\beta$ 1 5' 端區域之專一性引子對進行 PCR 反應，結果顯示於圖三 (B)、圖四(B)。未經過酵素切割的正控制組模板，於 358 bp 的位置有一明顯的 PCR 產物 (lane -)，*MspI* 切割後的負控制組模板則無 (lane M)，而以 *HpaII* 切割後的實驗組模板，則依此區域 CCGG 序列上的甲基化程度，而增幅出不同強度的 PCR 產物 (lane H)，甲基化程度越高，則此段 DNA 因不易被 *HpaII* 裁切，而得以形成較強的 PCR 產物；反之，若甲基化程度低，則 PCR 產物不明顯或無 PCR 產物。B $\beta$ 1 啟動子上游 -1974 ~ -1824 區域，因缺乏 CCGG 序列，故三種實驗條件處理後之基因組 DNA 模板，均能增幅出 151 bp 大小的 PCR 產物，作為內生性控制組 (internal control)。

進一步利用 Alphamager 1200 影像系統，比較 20 位正常人和 20 位阿茲海默氏症患者血液基因組 DNA 的甲基化程度。如圖三 C 所示，個別樣品間的甲基化程度差異很大，然阿茲海默氏症患者的平均甲基化程度稍高於正常人，但兩群間的差異未達顯著水準 (圖三 D,  $P > 0.05$ )。圖四 C 顯示各組年齡與性別配對的淋巴細胞 DNA 甲基化程度，個別樣品間的甲基化程度差異很大，其中第二、第四組阿

茲海默氏症的患者甲基化程度明顯高於正常人，但第五組則相反。兩群樣品間之平均甲基化程度，阿茲海默氏症患者稍高於正常人，但差異未達顯著水準(圖四 D， $P > 0.05$ )。

### (三) Bisulfite sequencing assay

利用 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 處理淋巴球 DNA，使 DNA 序列上的 C 鹼基轉變為 T 鹼基，然 CpG 上的 C 鹼基若發生甲基化，則不被轉變為 T 鹼基而維持 C 鹼基，藉由定序比較 DNA 序列上 T 鹼基與 C 鹼基的訊號強弱，可推知該樣本的甲基化程度。圖五為第五組正常人的定序結果，包括 RE-PCR 所辨認的三個 CCGG 在內，序列上大部分的 C 鹼基皆被轉變為 T，但第 8 個 CpG 則有少部分維持 CG。圖六為第三組阿茲海默氏症患者的定序結果，顯示第 1、2、4 個 C 鹼基被甲基化而維持不變，但 RE-PCR 所辨認的另外兩個 CCGG 皆被轉換成 TTGG。此二個 CCGG 序列於所檢測的 12 個樣品皆無甲基化情形。圖七為 6 組配對的阿茲海默氏症患者 (P1 ~ P6) 與正常人 (N1 ~ N6) 淋巴細胞株之甲基化程度量化圖。結果顯示正常人的 CpG 大多無甲基化，只有部分的樣本有零星的甲基化，且甲基化程度大多低於 50%，阿茲海默氏症的患者則富含甲基化的 CpG，且甲基化程度大多高於 50%，即阿茲海默氏

症的患者 B $\beta$ 1 序列上該區域的甲基化程度明顯高於正常人。

#### (四) Chromatin immunoprecipitation (CHIP)

爲了分析 B $\beta$ 1 與 B $\beta$ 2 啓動子區域的染色質結構，使用 CHIP 技術檢測此二異構型啓動子區域上組蛋白修飾的情形。如圖八(A)、(D) 所示，與未受超音波震盪處理相較 (lane -)，經過超音波震盪後，DNA 被震碎成小片段呈 smearing 現象 (lane +)。超音波處理後將樣品分成 A (未進行免疫沈澱，作爲正控制組)、B (不加抗體但進行免疫沈澱，作爲負控制組)、C (加抗體進行免疫沈澱，作爲實驗組) 三組，免疫沉澱反應的抗體包括辨認 dimethyl Histone H3 lysine 9 及辨認 acetyl Histone H3 lysine 14 的抗體。dimethyl Histone H3 lysine 9 的組蛋白修飾代表染色質結構緊密、低基因轉錄活性，而 acetyl Histone H3 lysine 14 的組蛋白修飾則代表染色質結構鬆散，利於基因轉錄作用。如圖八(B) (E) 所示，兩種抗體免疫沉澱的 DNA 模板，PCR 增幅後皆於所檢測的三個配對樣品偵測到代表 B $\beta$ 1 的 358 bp 片段與代表 B $\beta$ 2 的 301 bp 片段。利用 Alphamager 1200 影像系統定量後，得到各 AD/NC 配對的比值，顯示於圖八(C) (F)。三個配對的淋巴細胞株中，第 2、第 5 個配對的 Methyl-H3 比值大於 1，顯示此兩個阿茲海默氏症患者的 B $\beta$ 1 5' 端區域上，dimethyl H3-K9 的

比例較配對的正常人高，然第 4 個配對的 Methyl-H3 ratio 則小於 1，顯示該配對的阿茲海默氏症患者的 B $\beta$ 1 5' 端區域上，dimethyl H3-K9 比例較配對的正常人低。B $\beta$ 2 啓動子區域的 Methyl-H3 ratio、B $\beta$ 1 與 B $\beta$ 2 啓動子區域的 Acetyl-H3 ratio，於三個配對的細胞株中則無明顯差異，顯示這些區域上的修飾組蛋白比例於三個配對中並無太大區別。

#### (五) *PPP2R2B* 基因表現量與阿茲海默氏症的關聯性

使用 Real-time PCR-Taqman 的系統，檢測上述 6 個配對的阿茲海默氏症患者與正常人淋巴細胞中 *PPP2R2B* RNA 的表現量，結果顯示於圖九。由於所檢測到的 C<sub>T</sub> 值多數超過 35，代表樣品 RNA 濃度太低，實驗誤差相對提高，無法作為可信數據，故無法使用此數據做更進一步的分析。

## 二、阿茲海默氏症與血管性失智症的 B $\beta$ 1 基因啓動子多型性分析

### (一) B $\beta$ 1 基因啓動子定序

利用 B $\beta$ 1 基因啓動子的專一性引子對，放大三位正常人與三位血管性失智症患者 B $\beta$ 1 基因 -6718 ~ +23 的遠端啓動子片段，其

PCR 產物定序結果如圖十。共檢測到 -4329 G/A、-3177 C/T、-2930 A/G、-2737 G/A、-1918 T/A、-437 A/G 等多型性點，除 -4329 G/A 外，其餘五個多型性點在先前資料庫序列的比對中即已發現 (劉，2006)。故對此六個多型性點與阿茲海默氏症、血管性失智症之關聯性進行研究。

## (二) 啓動子多型性的 PCR-RFLP 檢測

-4329 G/A 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -4329 個核苷酸由 G 轉變爲 A 時，會新增限制酶 *Bci*VI (GTATCC) 切位，故包含 -4329A 等位基因的 PCR 產物能被 *Bci*VI 切割成 100 bp 與 51 bp 的片段，而包含 -4329G 等位基因的 PCR 產物經 *Bci*VI 作用後則呈現原來 151 bp 的片段 (圖十一A)。

-3177 C/T 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -3177 個核苷酸若由 C 轉變爲 T，會導致限制酶 *Bsm*AI (GTCTC) 切位消失，故包含 -3177T 等位基因的 PCR 產物經 *Bsm*AI 作用後呈現 272 bp 的片段，而包含 -3177C 等位基因的 PCR 產物則會被 *Bsm*AI 切割成 143 bp 與 129 bp 的二個片段 (圖十一B)。

-2930 A/G 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -2930 個核苷酸由 A 轉變爲 G 時，並未改變任何限制內切酶的切位，故設計誤配

引子，於 PCR 反應時引入 *SphI* 的切位。包含 -2930A 等位基因的 PCR 產物經限制酶 *SphI* 作用後呈現 401 bp 的片段，而包含 -2930G 等位基因的 PCR 產物經 *SphI* 切割後則呈現 379 bp 和 22 bp 的片段 (圖十一 C)。

-2737 G/A 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -2737 個核苷酸若由 G 轉變爲 A，則會使限制酶 *FinI* (GGGAC) 的切位消失，故 *FinI* 切割包含 -2737A 等位基因的 PCR 產物後僅呈現 101 bp 的片段，而包含 -2737G 等位基因的 PCR 產物則會被 *FinI* 切割成 67 bp 和 34 bp 的片段 (圖十一D)。

-1918 T/A 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -1918 個核苷酸若由 T 轉變爲 A，則能爲限制酶 *HindIII* (AAGCTT) 所辨識，故包含 -1918A 等位基因的 PCR 產物，經 *HindIII* 切割成 94 bp 與 57 bp 二個小片段，而包含 -1918T 等位基因的 PCR 產物則無法爲 *HindIII* 辨識，而呈現單一的 151 bp 片段 (圖十一E)。

-437 A/G 多型性：B $\beta$ 1 基因啓動子區域的第 -437 個核苷酸若由 A 轉變爲G，則會被限制酶 *AluI* (AGCT) 所辨識，故包含 -437G 等位基因的 PCR 產物經 *AluI* 切割成 38 bp 和 36 bp 的小片段，而包含 -437A 等位基因的 PCR 產物則因 *AluI* 無法辨識而呈現 74 bp 的片段 (圖十一F)。

### (三) 啓動子多型性的 SSCP 檢測

PCR-RFLP 檢測 -2737 G/A、-437 A/G 多型性時，由於部分樣品因酵素作用不完全，或切割後小片段不易辨識，故以螢光引子對進行 PCR 反應，使用 SSCP 的技術輔助此兩個多型性基因型的辨認。

-2737 G/A 多型性：如圖十二A 所示，GG 同基因型者出現 c、d 單股構象，AA 同基因型者出現 a、b 單股構象，GA 異基因型者則同時出現 a、b、c、d 單股構象。

-437 A/G 多型性：如圖十二B 所示，AA 同基因型者出現 a、d 單股構象，GG 同基因型者出現 b、c 單股構象，AG 異基因型者則同時出現 a、b、c、d 單股構象。

### (四) 正常人族群 B $\beta$ 1 啓動子多型性的哈溫平衡檢測

255 位正常人的 B $\beta$ 1 基因啓動子多型性分析結果如表四。所得觀察值與樣品總數推算之期望值做卡方檢定，除 -2737 G/A 多型性點外，-4329 G/A、-3177 C/T、-2930 A/G、-1918 T/A、-437 A/G 等五多型性點符合哈溫平衡 ( $P = 0.196 \sim 0.898$ )，其中 -2930 A/G 和 -437 A/G 的多型性基因型頻率及  $P$  值相同。

## (五) 多型性位點間的連鎖不平衡檢測

利用 SNPSpD 軟體之連鎖不平衡的相關矩陣，計算出 -4329、-3177、-2930、-2737、-1918、-437 等多型性位點之特徵值 (表五)，若所有的多型性位點皆連鎖，則第一特徵值會與多型性位點的數目相同。表五中對角線上之數值即為特徵值，其中第一特徵值 4.02 小於多型性位點數目 6，顯示此六個多型性位點並非完全連鎖。配合 LDMAX 軟體進一步分析各多型性位點間的連鎖不平衡程度，得到參數  $D'$  與  $\Delta^2$  值， $D'$  越接近 1 表示於遺傳的傳遞下此兩個多型性位點越不易重組， $\Delta^2$  值若趨近 1 則代表兩個多型性位點的連鎖不平衡關係越強烈。同時以此二值檢測此六個多型性位點的連鎖關係，發現 -2930 / -437 的  $D'$  值為 1、 $\Delta^2$  值為 0.97，皆高於其他 pairwise 的單套型，顯示此二位點連鎖性最高，此外 -4329 / -2930 以及 -4329 / -437 的  $D'$  值 (0.98、0.97) 與  $\Delta^2$  值 (0.82、0.81) 亦接近 1，顯示此些點的連鎖關係亦強。

## (六) 啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症感受性的相關性

238 位阿茲海默氏症病患、74 位血管性失智症病患與 255 位正常人之  $B\beta 1$  基因啓動子多型性分析結果如表六、表七。以卡方檢定個別分析阿茲海默氏症、血管性失智症與正常人族群，各多型性位點

的基因型分佈與等位基因頻率，於兩種病患和正常人族群間無顯著性差異 ( $P > 0.05$ )。

進一步利用 PHASE 軟體分析六個多型性位點間形成的各種單套型於三個不同族群的分佈情形，結果顯示於表八，單套型中 0 表示常見的等位基因、1 表示多型性的等位基因，於三個族群中，最常見的單套型為 010000，即 -4329G、-3177T、-2930A、-2737G、-1918T、-437A。各種不同的單套型於兩種病患和正常人族群間並無顯著差異 ( $P > 0.05$ )。

### 三、B $\beta$ 1 啓動子 CAG 三核苷酸重複之遺傳資料庫擴充

本研究分析台灣地區四個不同的樣品群之 B $\beta$ 1 基因啓動子 CAG 重複的次數，包含 60 個正常人、73 個帕金森氏症、53 個原發性顫抖症、75 個舞蹈症及肌張力異常症等其他疾病和其家屬。圖十三、表九顯示 CAG 三核苷酸重複次數的等位基因頻率分佈，圖十四顯示 CAG 三核苷酸重複次數的多型性基因型分佈。正常人族群與其他神經退化性疾病患者間，B $\beta$ 1 基因啓動子 CAG 重複的次數的分佈並無明顯差異。各樣品群中最常見 CAG 三核苷酸重複次數為 10、13、16，比例分別為 24.3 ~ 30.2%、22.6 ~ 36.3%、14.7 ~ 19.4%。

正常人、金森氏症、原發性顫抖症、其他等樣品群中，CAG 重複範圍 / 平均重複次數 (標準差) 分別為：9 ~ 24 / 13.1 (2.8)、9 ~ 25 / 13.6 (3.2)、9 ~ 27 / 13.4 (3.3)、4 ~ 24 / 13.3 (3.2)。在其他樣品群中，發現二位舞蹈症患者 (2%) 具有罕見短的 (CAG)<sub>4</sub> 和 (CAG)<sub>6</sub> 等位基因，其定序結果顯示於圖十五。

## 伍、討論

### 一、阿茲海默氏症的外遺傳研究

#### (一) B $\beta$ 1 啓動子區域 DNA 甲基化程度

本研究以 RE-PCR 分析 20 個正常人與 20 個阿茲海默氏症患者，B $\beta$ 1 5' 端區域在個別樣品間的甲基化程度差異很大，正常人族群中甲基化程度範圍為 0~46%，阿茲海默氏症患者則為 0~59%。整體而言，阿茲海默氏症患者 DNA 甲基化程度較正常人稍高，但兩群樣品間未達顯著差異 (圖三)。另一方面，六組經過年齡與性別配對的淋巴細胞株中，第二、第四組配對之阿茲海默氏症患者甲基化程度高於正常人，但第五組則相反，第一、第六組配對則無顯著差異 (圖四)。此結果顯示 B $\beta$ 1 5' 端區域甲基化不一定和阿茲海默氏症相關。Silva 等人研究 *SIRT3*、*SMARCA5*、*HTERT*、*CDHI* 基因啓動子甲基化的結果顯示，與端粒、免疫反應相關的基因 *HTERT*，其啓動子區域甲基化程度，阿茲海默氏症患者明顯較正常人族群高，而其他三個基因則無顯著差異 (Silva *et al.*, 2008)。本研究探討的 *PPP2R2B*，為腦專一性表現，於淋巴球中表現甚低，此組織特異性可能無法呈現顯著的甲基化差異。其次，本研究的樣品數量過少，也可能降低兩群

間甲基化程度差異在統計上的意義。再者，本實驗使用傳統的 RE-PCR 檢測，僅能分析少數 *Hpa* II 與 *Msp* I 辨認序列上的甲基化之情形，故後來採用 Bisulfite sequencing 檢測法，以 sodium bisulfite 將未甲基化的 C 鹼基轉換成 U，而甲基化的 C 則不變，進行 PCR 反應後將產物做定序，來一一分析此 5' 端區域內每一個 CG 的甲基化程度，結果顯示阿茲海默氏症患者的甲基化程度較正常人高 (圖七)。但定序結果亦顯示 RE-PCR 限制酶所辨認的三個 CCGG 中，只有第二個辨認位置有甲基化的情形 (圖五、六 B)，其餘兩個位置皆無甲基化的情形 (圖五、六 A、E)。由於無甲基化的 CCGG 會被 *Hpa*II 辨認、切割，故 PCR 後應無產物，與圖三、圖四的實驗結果不合。故 RE-PCR 所觀察到的差異可能為酵素切割不完全，造成誤判甲基化的情形，故 bisulfite sequencing assay 所得結果較能代表該樣本的甲基化程度。

## (二) *PPP2R2B* 啓動子區域的染色質結構

染色質可藉不同組蛋白修飾改變其結構，調控基因的轉錄與表現，組蛋白 H3 的第九、第十四個胺基酸-離胺酸之乙醯化與基因轉錄活化有關；而組蛋白 H3 的第九胺基酸-離胺酸發的甲基化修飾，則與抑制轉錄作用相關 (Yan and Boyd, 2006)。先前 Greene 等人於

單一基因突變的富來德瑞克氏共濟失調症 (Friedreich ataxia, 簡稱 FRDA) 的研究中, 以 CHIP 的技術分析 *frataxin* (*FXN*) 基因的染色質結構與其表現的關聯, 結果顯示 FRDA 的患者於 *FXN* 基因的啓動子區域有較高的 dimethyl H3-K9, 同時患者的 *FXN* mRNA 表現量亦有下降的情形 (Greene *et al.*, 2007)。本研究使用 CHIP-PCR 分析與 B $\beta$ 1 與 B $\beta$ 2 啓動子區域結合之組蛋白的修飾, 進而推測基因轉錄作用的活化與抑制。本研究於三個配對的淋巴細胞株中, 比較 B $\beta$ 1 啓動子區域上 dimethyl H3-K9 的比例, 雖然有兩組顯示阿茲海默氏症患者 dimethyl H3-K9 修飾較正常人高, 顯示 dimethyl H3-K9 修飾可能影響 B $\beta$ 1 啓動子區域的染色質結構, 導致阿茲海默氏症的發生, 但另一組配對則相反。而 dimethyl H3-K9 與 B $\beta$ 2 啓動子區域、acetyl H3-K14 與 B $\beta$ 1、B $\beta$ 2 啓動子區域的比例於兩群樣品中並無明顯差異 (圖八)。阿茲海默氏症具高度遺傳異質性, 非單一基因所調控, 而 FRDA 爲 *FXN* 基因突變的隱性遺傳疾病, 兩者間遺傳背景的複雜度差異很大, 可能造成結果的差異。另一可能造成差異的因素爲偵測 PCR 產物的方法, 本研究從電泳膠體圖上定 PCR 產物的量, 此定量方式由於沒有可供參照的控制組, 所以無法排除人爲操作的誤差, 而 Greene 等人使用 real-time PCR 的技術定 *FXN* DNA (經染色質免疫沈澱), 可降低人爲操作的誤差, 故後續研究的方向可使

用此技術。

### (三) *PPP2R2B* mRNA 的表現量

本研究以淋巴細胞株為材料，使用 real-time PCR 技術比較阿茲海默氏症患者與正常人 *PPP2R2B* mRNA 表現量，但由於淋巴細胞株中的 *PPP2R2B* mRNA 含量太低而無法有效比較 (圖九)。*PPP2R2B* 為腦特異性表現基因，因此推測在其他組織或細胞株中的表現量不高。Schild 等人研究指出，人類胚胎腎細胞株 (Human embryonic kidney HEK293) 和人類神經瘤細胞株 (SH-SY5Y) 中，*PR55α*、*PR55β* (*PPP2R2B*)、*PR55γ*、*PR55δ* 等四種 B 次單位的 mRNA 表現量不同，SH-SY5Y 中 *PR55α* 表現量最高而 *PR55β* (*PPP2R2B*) mRNA 之含量最低，而 HEK293 細胞株中則無法偵測到 *PPP2R2B* 的 mRNA 的存在 (Schild *et al.*, 2006)，顯示非腦部組織的其他細胞株中 *PPP2R2B* 的 mRNA 表現量甚低，此結果與本研究數據相符。

### (四) DNA 甲基化、組蛋白修飾與基因表現

DNA 甲基化會與甲基化結合蛋白結合，進而吸引組蛋白去乙酰化酶前來，促使組蛋白發生去乙酰化，形成較緊密的染色質結構，阻礙

轉錄因子與啓動上轉錄活化位的結合，使轉錄作用無法執行，而降低基因的表現。Al-Mahdawi 等人針對基因表現的機轉，提出另一個看法，組蛋白 H3K9 發生去乙醯化而導致組蛋白 H3K9 甲基化，吸引 heterochromatin protein 1 (HP1)、組蛋白去乙醯酶與 DNA 甲基轉移酶，而造成 DNA 甲基化，進而關閉基因轉錄作用 (Al-Mahdawi *et al.*, 2008)。組蛋白的修飾並非一定伴隨 DNA 的甲基化，*fragile X mental retardation 1 (FMR1)* 基因啓動子區域缺乏甲基化，但仍發生組蛋白去乙醯化與組蛋白 H3K9 甲基化，雖然此狀況並不影響 *FMR1* 的基因轉錄調節 (Pietrobono *et al.*, 2005)。綜合上述的結果，DNA 甲基化與組蛋白修飾間並非完全連結，此兩者調節基因表現的機制可能是獨立的。而本研究的結果顯示 B $\beta$ 1 5' 端區域的甲基化程度 (圖七) 與組蛋白的修飾 (圖八) 亦無明顯關聯。

## 二、B $\beta$ 1 基因啓動子多型性與阿茲海默氏症、血管性失智症感受性的相關性

本研究分析 B $\beta$ 1 啓動子區域上六個多型性位點，無論是在多型性基因型 (表六) 或等位基因 (表七) 頻率分佈層面，都未發現任一多型性位點與阿茲海默氏症或血管性失智症之感受性有相關 ( $P >$

0.05)。進一步的多型性位單套型分析結果 (表八)，亦顯示並無特定單套型與阿茲海默氏症與血管性失智症相關，即此六點之單套型頻率對疾病的發生無太大影響。

B $\beta$ 1 啓動子之六個多型性位點的哈溫平衡檢測，除多型性位點 -2737，其餘五點皆符合哈溫定律 (表四)，顯示取樣的正常人爲自由婚配、配子亦可隨機結合，且不因突變、遷徙或天擇等演化動力而影響基因頻率的分佈。而多型性位點 -2737 不符合哈溫平衡，造成此結果的因素不明。

### 三、臺灣地區 B $\beta$ 1 啓動子 CAG 三核苷酸重複之遺傳資料庫

本研究分析臺灣地區四個不同樣品群之 B $\beta$ 1 基因啓動子 CAG 重複的次數，包含 60 位正常人、73 位帕金森氏症患者、53 位原發性顫抖症患者和 75 位舞蹈症及肌張力異常症等其他疾病和其家屬。統計顯示，臺灣的正常人族群中，CAG 的重複次數範圍爲 9 ~ 24，最常見之等位基因型式 (頻率) 爲 (CAG)<sub>10</sub> (30.2%)、(CAG)<sub>13</sub> (31.0%)、(CAG)<sub>16</sub> (16.4%) (表九)，此結果與本實驗室先前研究成果相符 (劉，2006)，但與義大利、波蘭最常見的等位基因型式相異：(CAG)<sub>10</sub>、(CAG)<sub>13</sub>、(CAG)<sub>15</sub>，與法國、義大利、波蘭、高加索人、印度和南非等族群亦不盡相同 (Fujigasaki *et al.*, 2001; Srivastava *et*

*al.*, 2001; Brusco *et al.*, 2002; Laurent *et al.*, 2003; Sulek *et al.*, 2004; Majounie *et al.*, 2007)。Tsai 等人於 2004 年的統計資料中顯示，臺灣族群之 CAG 三核苷酸重複次數大於 15 的等位基因出現頻率較其他族群高 (Tsai *et al.*, 2004)，本篇研究結果 (表九) 亦符合上述結果。

本研究中四個樣品群並未發現 CAG 的重複有不正常的擴增情形，但在其他神經相關疾病的族群中，發現兩名舞蹈症患者具有罕見短的 CAG 重複之等位基因 (CAG)<sub>4</sub> (異型合子) 和 (CAG)<sub>6</sub> (同型合子)，分別佔整個族群的 0.7% 和 1.4%。先前本實驗室的研究亦發現於阿茲海默氏症患者的族群中具有較高比例的 (CAG)<sub>7</sub> 等位基因 (2.8%) (侯，2005)；原發性顫抖症患者樣品群中亦發現 (CAG)<sub>5</sub> (0.5%) 和 (CAG)<sub>6</sub> (1.5%) 之等位基因 (劉，2006)。此罕見較短的等位基因也存在於其他血統族群中，如 Holmes 等人於歐裔正常人及神經相關疾病 (帕金森氏症、亨汀頓式舞蹈症、運動失調症) 共 2986 條等位基因分析中，發現一條 (CAG)<sub>7</sub> 之等位基因存在 (Holmes *et al.*, 1999)。印度族群的研究亦報導中 (CAG)<sub>7</sub> 的等位基因，但頻率並不高 (Srivastava *et al.*, 2001)。而先前本實驗室的研究成果發現，包含 (CAG)<sub>5-7</sub> 等位基因的啓動子活性，約只有較常見的 (CAG)<sub>10</sub>、(CAG)<sub>13</sub>、(CAG)<sub>16</sub> 之等位基因的 60% (Chen *et al.*, 2008)。此結果暗示較短的 CAG 重複次數會降低 B $\beta$ 1 基因啓動子活性，進而增加神

經相關疾病的感受性。比較 (CAG)<sub>4</sub> 之啓動子活性是否伴隨重複次數的減少而下降，及重複次數與 B $\beta$ 1 基因表現量之相關性，應是值得深入探討的問題。

## 陸、參考文獻

侯懿婷。退化性神經疾病：*PPP2R2B* 基因族群遺傳分析及分生研究。

國立台灣師範大學生命科學系九十三學年度碩士論文。2005。

劉若芸。*PPP2R2B* 基因遺傳檢測、啟動子記述與單一鹼基多型性分

析。國立台灣師範大學生命科學系九十五學年度碩士論文。2007。

Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lympieri S, Sandi C, Trabzuni D, Pook M. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 735-746.

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK. Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 1991; **128**: 126-128.

Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vázquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 1998a; **421**: 105-108.

Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, Lendon CL, Han SW, Morris JC, Vázquez J, Goate A, Valdivieso F. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet* 1998b; **7**: 1887-1892.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; **16**: 6-21.

- Brusco A, Cagnoli C, Franco A, Dragone E, Nardacchione A, Grosso E, Mortara P, Mutani R, Migone N, Orsi L. Analysis of SCA8 and SCA12 loci in 134 Italian ataxic patients negative for SCA1-3, 6 and 7 CAG expansions. *J Neurol* 2002; **249**: 923-929.
- Capell A, Saffrich R, Olivo JC, Meyn L, Walter J, Grunberg J, Mathews P, Nixon R, Dotti C, Haass C. Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J Neurochem* 1997; **69**: 2432-2440.
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; **53**: 3-4.
- Chen CM, Hou YT, Liu JY, Wu YR, Lin CH, Fung HC, Hsu WC, Hsu Y, Lee SH, Hsieh-Li HM, Su MT, Chen ST, Lane HY, Lee-Chen GJ. PPP2R2B CAG repeat length in the Han Chinese in Taiwan: Association analyses in neurological and psychiatric disorders and potential functional implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008. [Epub ahead of print]
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 2000; **103**: 263-271.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; **261**: 921-923.
- Cummings JL. Vascular subcortical dementias: clinical aspects. *Dementia* 1994; **5**: 177-180.
- Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S. A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit

- Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24976-24985.
- Desmond DW. Vascular dementia: a construct in evolution. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996; **8**: 296-325.
- Dowjat WK, Wisniewski T, Efthimiopoulos S, Wisniewski HM. Inhibition of neurite outgrowth by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *Neurosci Lett* 1999; **267**: 141-144.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M. Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK / ERK, SAPK / JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **94**: 48-58.
- Fujigasaki H, Verma IC, Camuzat A, Margolis RL, Zander C, Lebre AS, Jamot L, Saxena R, Anand I, Holmes SE, Ross CA, Dürr A, Brice A. SCA12 is a rare locus for autosomal dominant cerebellar ataxia: a study of an Indian family. *Ann Neurol* 2001; **49**: 117-121.
- Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 2005; **1**: 195-204.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; **349**: 704-706.

- Goedert, M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993; **16**: 460-465.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1995; **65**: 732-738.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5535-5544.
- Gotz, J. Tau and transgenic animal models. *Brain Res Rev* 2001; **35**: 266-286.
- Greene E, Mahishi L, Entezam A, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 3383-3390.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986a; **261**: 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein  $\tau$  in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 1986b; **83**: 4913-4917.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB.

- Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992; **359**: 322-325.
- Healy AM, Zolnierowicz S, Stapleton AE, Goebel M, DePaoli-Roach AA, Pringle J R. CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 5767-5780.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieria-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 1999; **23**: 391-392.
- Holmes SE, O'Hearn E, Margolis RL. Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet Genome Res* 2003; **100**: 189-197.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal, I, Smith AJ, George L, Tung YC, Zaidi T. Identification and localization of a tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1989; **86**: 5646-5650.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end specific A $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43). *Neuron* 1994; **13**: 45-53.
- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem J* 2001; **353**: 417-439.

- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999; **19**: 7486-7494.
- Kim Y, Nam YJ, Lee C. Analysis of the SREBF2 gene as a genetic risk factor for vascular dementia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; **139**: 19-22.
- Kim Y, Kim JH, Nam YJ, Kim YJ, Yu KH, Lee BC, Lee C. Sequence variants of ACE, AGT, AT1R, and PAI-1 as genetic risk factors for vascular dementia. *Neurosci Lett* 2006; **401**: 276-279.
- Kim Y, Lee C. The gene encoding transforming growth factor beta 1 confers risk of ischemic stroke and vascular dementia. *Stroke* 2006; **37**: 2843-2845.
- Laurent C, Niehaus D, Bauché S, Levinson DF, Soubigou S, Pimstone S, Hayden M, Mbanga I, Emsley R, Deleuze JF, Mallet J. CAG repeat polymorphisms in KCNN3 (HSKCa3) and PPP2R2B show no association or linkage to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; **116**: 45-50.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos Jr L, Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 1991; **251**: 675-678.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; **269**: 973-977.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau

- phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 1942-1950.
- Looi JC, Sachdev PS. Differentiation of vascular dementia from AD on neuropsychological tests. *Neurology* 1999; **53**: 670-678.
- Lv H, Jia L, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008; **29**: 194-202.
- Majounie E, Wardle M, Muzaimi M, Cross WC, Robertson NP, Williams NM, Morris HR. Case control analysis of repeat expansion size in ataxia. *Neurosci Lett* 2007; **429**: 28-32.
- Mani ST, Thakur MK. In the cerebral cortex of female and male mice, amyloid precursor protein (APP) promoter methylation is higher in females and differentially regulated by sex steroids. *Brain Res* 2006; **1067**: 43-47.
- Mayer RE, Hendrix P, Cron P, Matthies R, Stone SR, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Hemmings BA. Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry* 1991; **30**: 3589-3597.
- Mori S, Cao Y, Sogawa K, Kondo K, Sakai T, Hino N, Yamashiro H, Okada M, Miyamoto K, Kawaguchi Y, Mashiba T, Norimatsu H. Enhanced expression of protein phosphatase 2A associated with hyper-phosphorylation of histone H1 in Alzheimer's disease brain. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2003; **113-114**: 67-73.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1992; **1**: 345-347.

- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt–Jakob disease. *Brain Res* 1991; **541**: 163-166.
- Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 765-769.
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 70-78.
- Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B, Cowburn RF. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 1998; **797**: 267-277.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 1010-1019.
- Pietrobono R, Tabolacci E, Zalfa F, Zito I, Terracciano A, Moscato U, Bagni C, Oostra B, Chiurazzi P, Neri G. Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 267-277.
- Price NE, Mumby MC. Brain protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Neurobiol* 1999; **9**: 336-342.
- Ringman JM, Rao PN, Lu PH, Cederbaum S. Mosaicism for trisomy 21

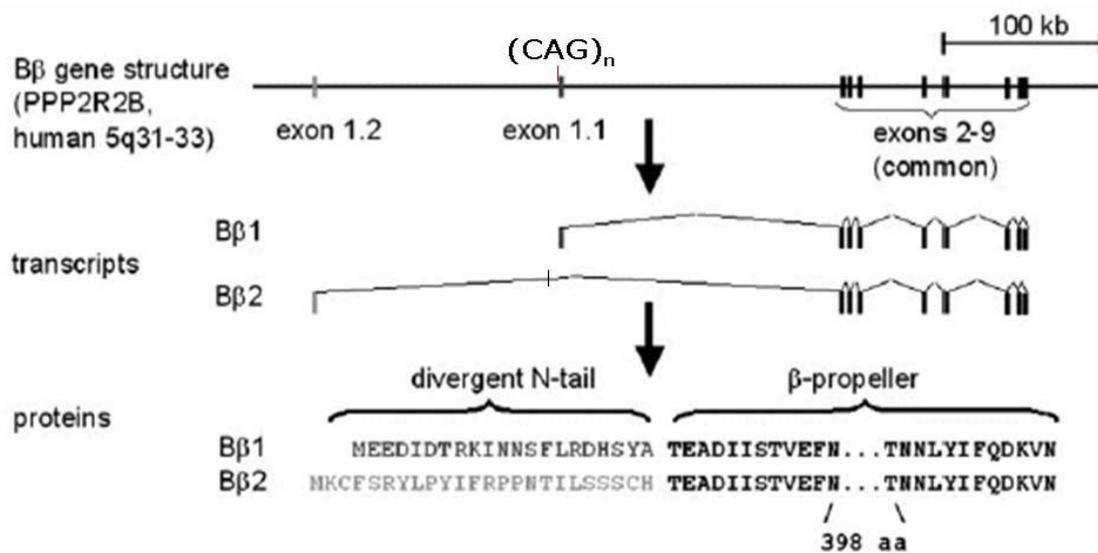
- in a patient with young-onset dementia: a case report and brief literature review. *Arch Neurol* 2008; **65**: 412-415.
- Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng YW, Brady MJ, Mankovich JA, Hackett MC, Ghayur T, Walter G, Wong WW, Giegel DA. Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13119-13128.
- Scarpa S, Fusco A, D'Anselmi F, Cavallaro RA. Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett* 2003; **541**: 145-148.
- Scarpa S, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Fusco A. Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 2006; **9**: 407-414.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992; **258**: 668-671.
- Schild A, Schmidt K, Lim YA, Ke Y, Ittner LM, Hemmings BA, Götz J. Altered levels of PP2A regulatory B/PR55 isoforms indicate role in neuronal differentiation. *Int J Dev Neurosci* 2006; **24**: 437-443.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 1992; **359**: 325-327.
- Shiomi K, Takeichi M, Nishida Y, Nishi Y, Uemura T. Alternative cell fate choice induced by low-level expression of a regulator of protein

- phosphatase 2A in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Development* 1994; **120**: 1591-1599.
- Silva PN, Giguek CO, Leal MF, Bertolucci PH, de Labio RW, Payão SL, Smith Mde A. Promoter methylation analysis of SIRT3, SMARCA5, HTERT and CDH1 genes in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008; **13**: 173-176.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC. Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 1996; **17**: 1201-1207.
- Srivastava AK, Choudhry S, Gopinath MS, Roy S, Tripathi M, Brahmachari SK, Jain S. Molecular and clinical correlation in five Indian families with spinocerebellar ataxia 12. *Ann Neurol* 2001; **50**: 796-800.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 978-989.
- Strack S, Zaucha JA, Ebner FF, Colbran RJ, Wadzinski BE. Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *J Comp Neurol* 1998; **392**: 515-527.
- Sulkava R, Kainulainen K, Verkkoniemi A, Niinisto L, Sobel E, Davanipour Z, Polvikoski T, Haltia M, Kontula K. APOE alleles in Alzheimer's disease and vascular dementia in a population aged 85+. *Neurobiol Aging* 1996; **17**: 373-376.
- Sulek A, Hoffman-Zacharska D, Bednarska-Makaruk M, Szirkowiec W,

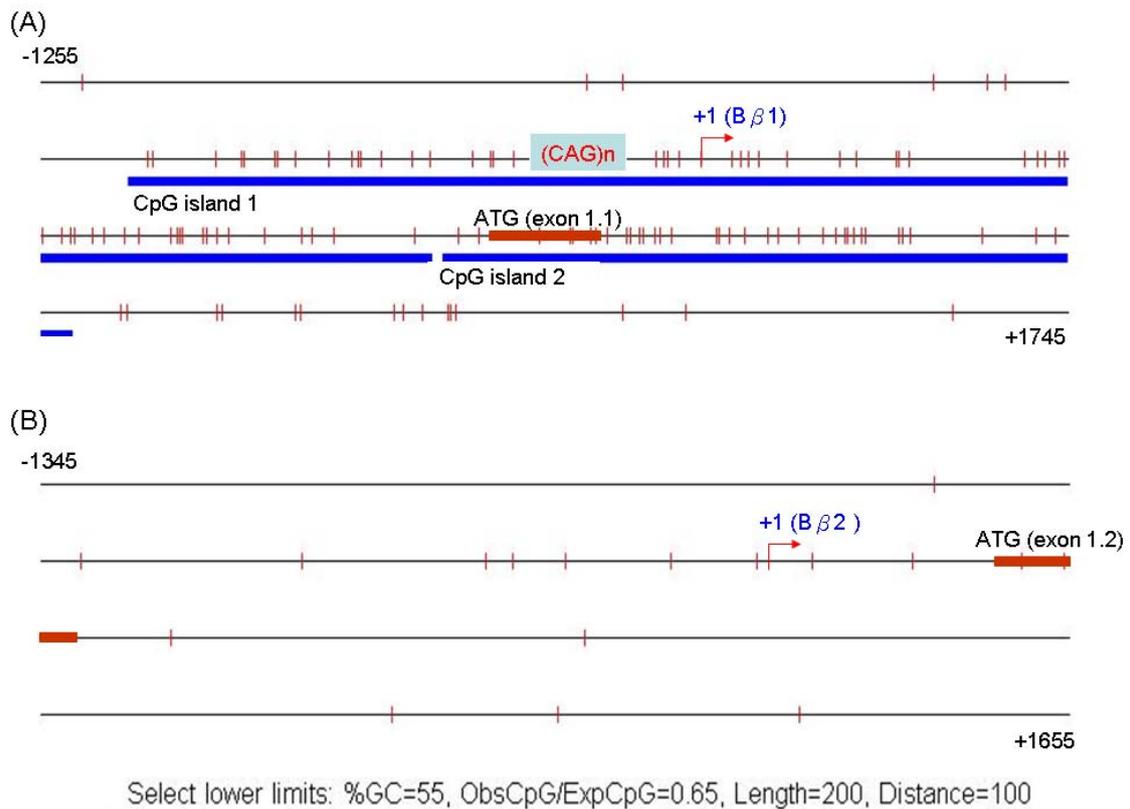
- Zaremba J. Polymorphism of trinucleotide repeats in non-translated regions of SCA8 and SCA12 genes: allele distribution in a Polish control group. *J Appl Genet* 2004; **45**: 101-105.
- Takai D, Jones PA. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* 2003;**3**:235-240.
- Tsai HF, Liu CS, Leu TM, Wen FC, Lin SJ, Liu CC, Yang DK, Li C, Hsieh M. Analysis of trinucleotide repeats in different SCA loci in spinocerebellar ataxia patients and in normal population of Taiwan. *Acta Neurol Scand* 2004; **109**: 355-360.
- Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 1997-2015.
- Virshup DM. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 180-185.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci* 1975;**72**: 1858-1862.
- Wu J, Basha MR, Zawia NH. The environment, epigenetics and amyloidogenesis. *J Mol Neurosci* 2008; **34**: 1-7.
- Xiao J, Perry G, Troncoso J, Monteiro MJ. Alpha-calcium-calmodulin -dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 954-963.
- Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/ glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta*

*Neuropathol (Berl)* 1996; **92**: 232-241.

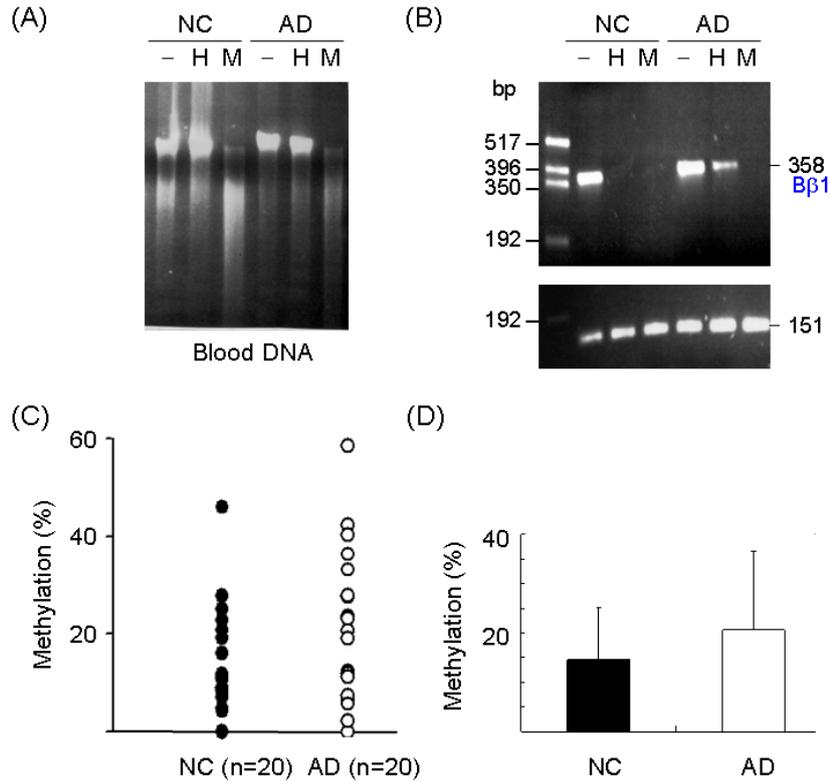
Yan C, Boyd DD. Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 6357-6371.



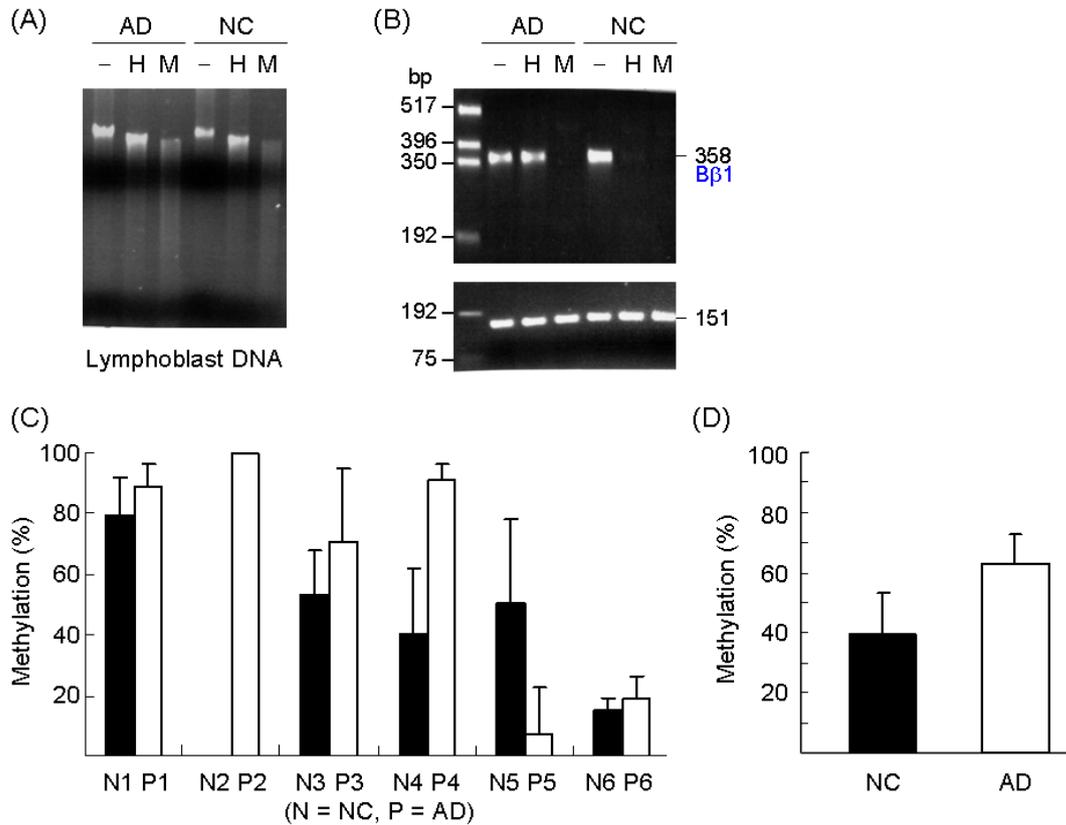
圖一、*PPP2R2B* 基因的結構與其所表現的轉錄體和蛋白質。外顯子 (exon) 1.1 或 1.2 的啓動子差異使用及選擇性裁接，產生 N 端相異的 B $\beta$ 1 及 B $\beta$ 2 兩種異構型。外顯子 1.1 上具有 CAG 三核甘酸重複 (CAG)<sub>n</sub> (圖片出自 Dagda *et al.*, 2003)



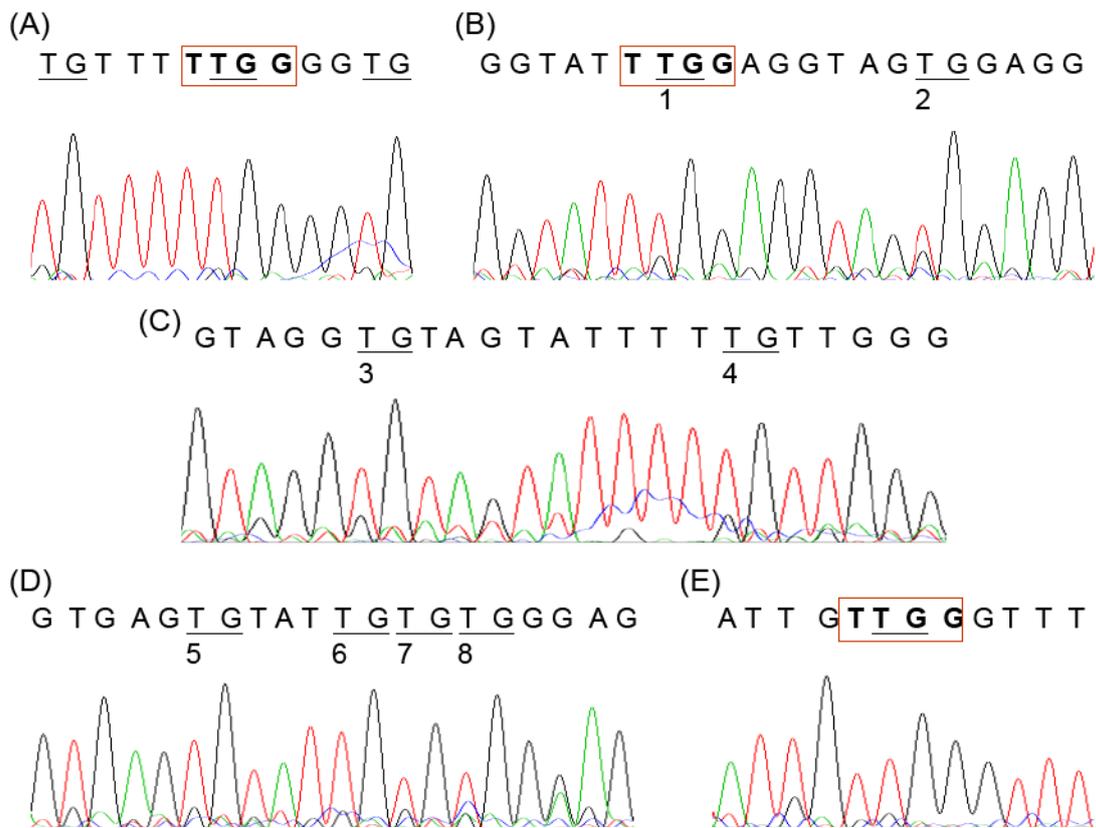
圖二、 $B\beta 1$  (A)、 $B\beta 2$  (B) 啓動子及 5' 端外顯子區域的 CpG 島預測分析 (<http://cpgislands.usc.edu/cpg.aspx>)。彎曲箭頭 +1 標示處爲  $B\beta 1$ 、 $B\beta 2$  的轉錄起始位置，標示 ATG 處爲外顯子 1.1、1.2 轉譯的起始點。藍色長方形標示處爲 CpG 島， $B\beta 1$  啓動子及 5' 端外顯子區域具有兩個 CpG 島， $B\beta 2$  啓動子及 5' 端外顯子區域則無 CpG 島的存在。



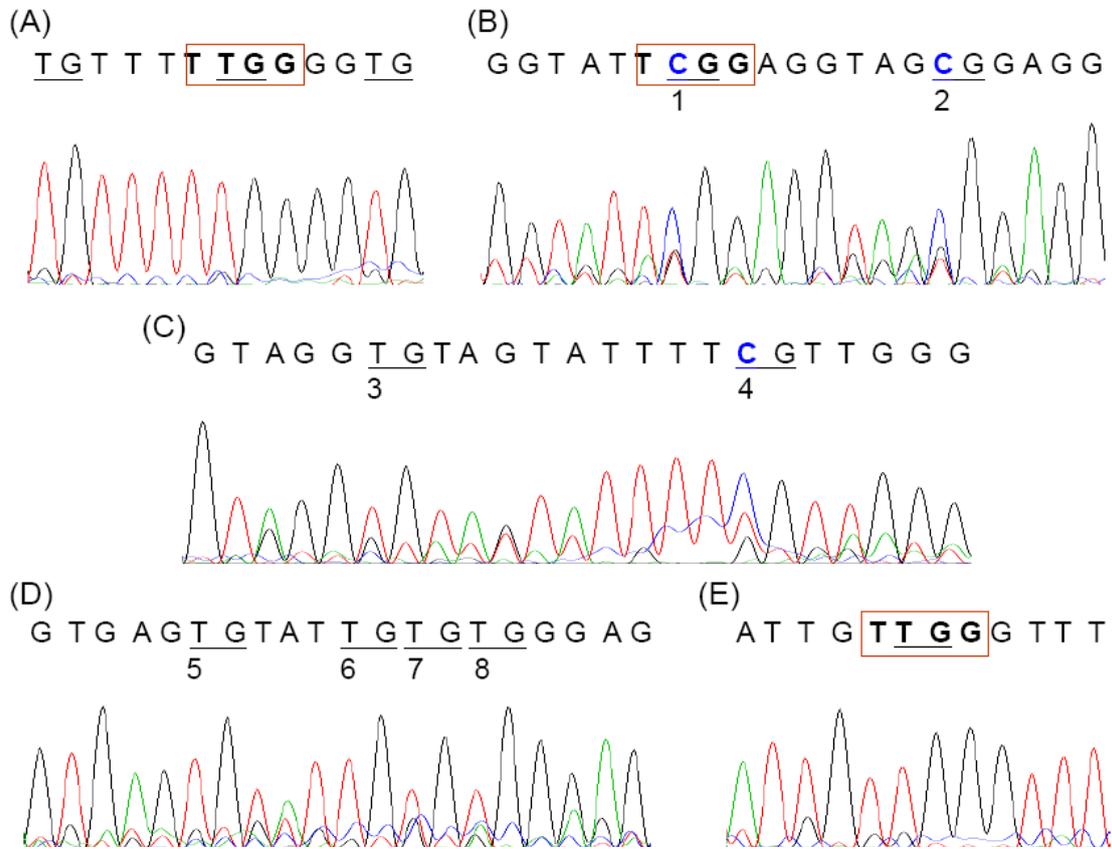
圖三、白血球 DNA 的 B $\beta$ 1 5' 端區域的 RE-PCR 甲基化檢測分析。(A) 正常人 (NC) 與阿茲海默氏症患者 (AD) 白血球的基因組 DNA 分別經過未添加酵素 (-)、添加甲基化敏感酵素 *Hpa*II (H)、添加甲基化不敏感酵素 *Msp*I (M) 處理的 0.8% 瓊脂膠體電泳分析圖。(B) 以上述處理後基因組 DNA 為模板之 PCR 產物 (B $\beta$ 1 5'UTR 區域, +111 ~ +468, 358 bp) 的 1.4% 瓊脂膠體電泳分析圖, PCR 增幅 B $\beta$ 1 遠端啟動子片段 (-1974 ~ -1824, 151 bp) 作為內在對照組。(C) 20 位正常人與 20 位阿茲海默氏症患者之甲基化程度的分佈圖。(D) 上述正常人與阿茲海默氏症患之甲基化程度量化圖。



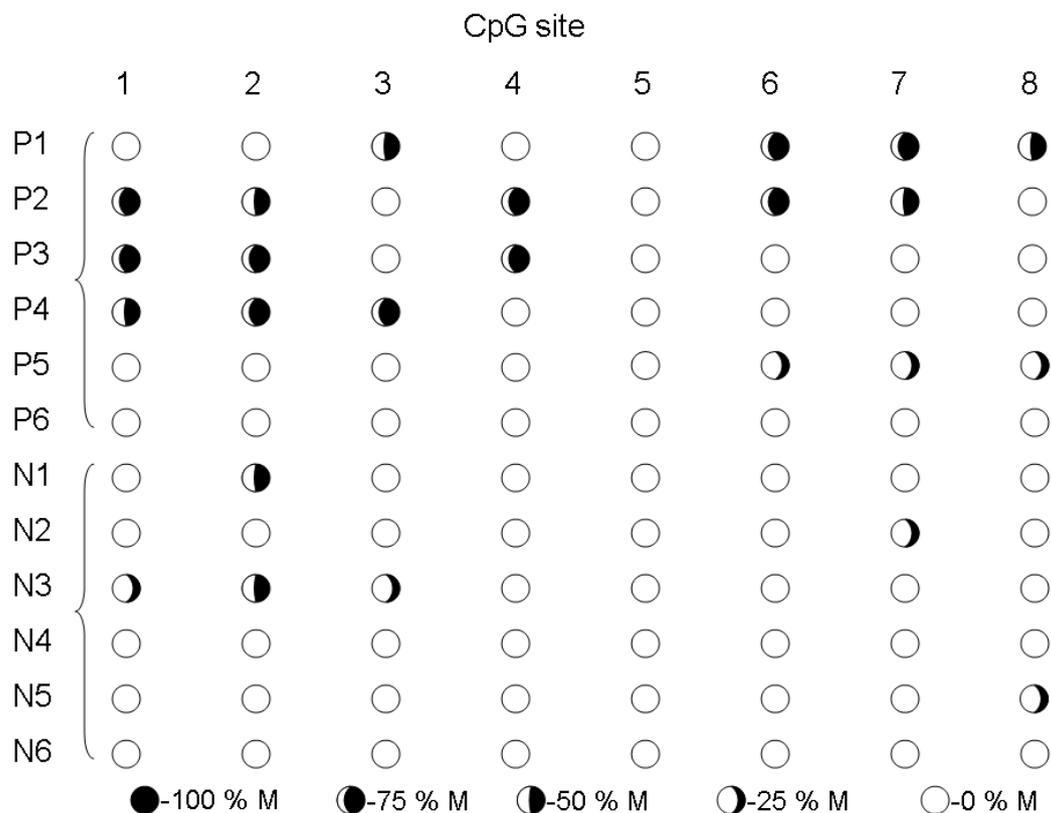
圖四、淋巴細胞株 DNA 的 B $\beta$ 1 5' 端區域的 RE-PCR 甲基化檢測分析。(A) 正常人 (NC) 與阿茲海默氏症患者 (AD) 淋巴細胞株的基因組 DNA 分別經過未添加酵素 (-)、添加甲基化敏感酵素 *Hpa*II (H)、添加甲基化不敏感酵素 *Msp*I (M) 處理的 0.8% 瓊脂膠體電泳分析圖。(B) 以上述處理後基因組 DNA 為模板之 PCR 產物 (B $\beta$ 1 5'UTR 區域, +111 ~ +468, 358 bp) 的 1.4% 瓊脂膠體電泳分析圖, PCR 增幅 B $\beta$ 1 遠端啟動子片段 (-1974 ~ -1824, 151 bp) 作為內在對照組。(C) 6 組年齡與性別配對的正常人 (N1~N6)、阿茲海默氏症患者 (P1~P6) 淋巴細胞株之甲基化程度的分佈圖。(D) 上述配對的 6 組正常人與阿茲海默氏症患者淋巴細胞株之甲基化程度量化圖。



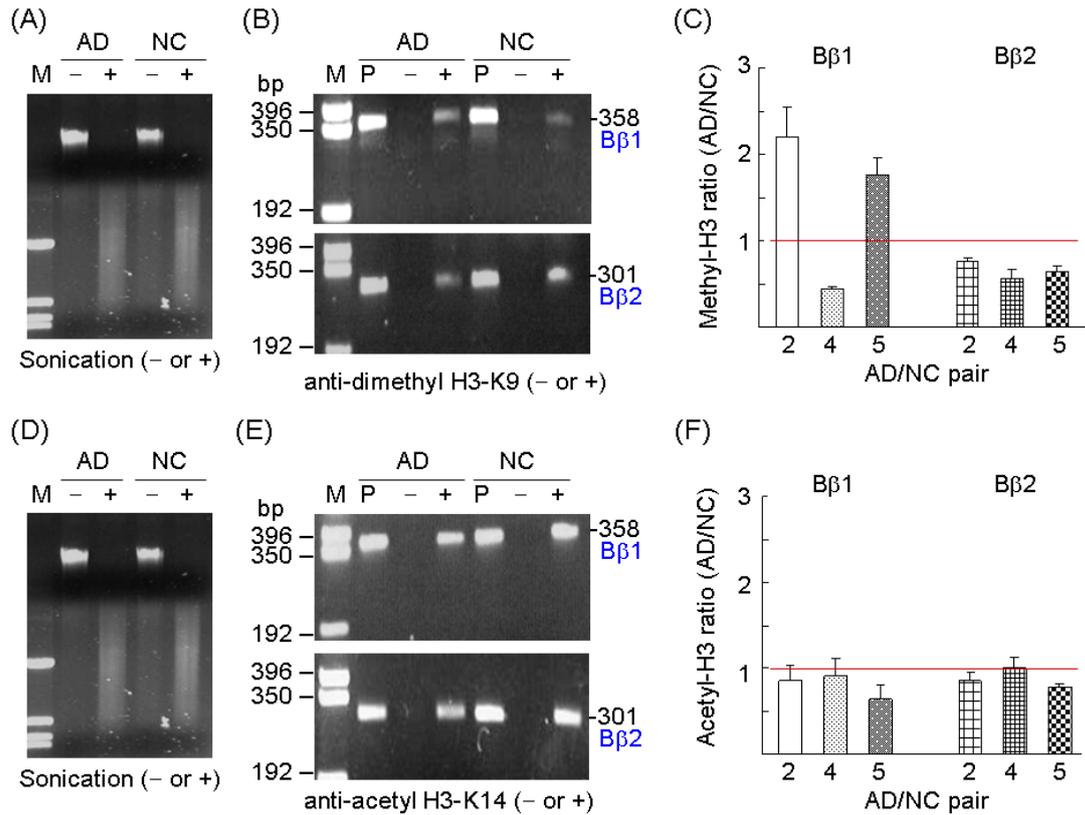
圖五、N5 正常人淋巴細胞株 DNA 的 B $\beta$ 1 5' 端區域的 Bisulfite sequencing 甲基化檢測分析。(A) ~ (E) 為包含 B $\beta$ 1 5'UTR RE-PCR 甲基化檢測區域 (+49 ~ +543, 495 bp) 序列中的部分 CpG 島，TG 代表未被甲基化的 CpG，TTGG 為 RE-PCR 技術中酵素 *HpaII* 與 *MspI* 所辨認的位置。TG 下方數字 (1 ~ 8) 為圖七比較的 8 個 CpG 位置。



圖六、P3 阿茲海默氏症患者淋巴細胞株 DNA 的 B $\beta$ 1 5' 端區域的 Bisulfite sequencing 甲基化檢測分析。(A) ~ (E) 為包含 B $\beta$ 1 5'UTR RE-PCR 甲基化檢測區域 (+49 ~ +543, 495 bp) 序列中的部分 CpG 島，TG 代表未被甲基化的 CpG，CG 代表甲基化的 CpG，TTGG 為 RE-PCR 技術中酵素 *HpaII* 與 *MspI* 所辨認的位置。TG 或 CG 下方數字 (1 ~ 8) 為圖七比較的 8 個 CpG 位置。

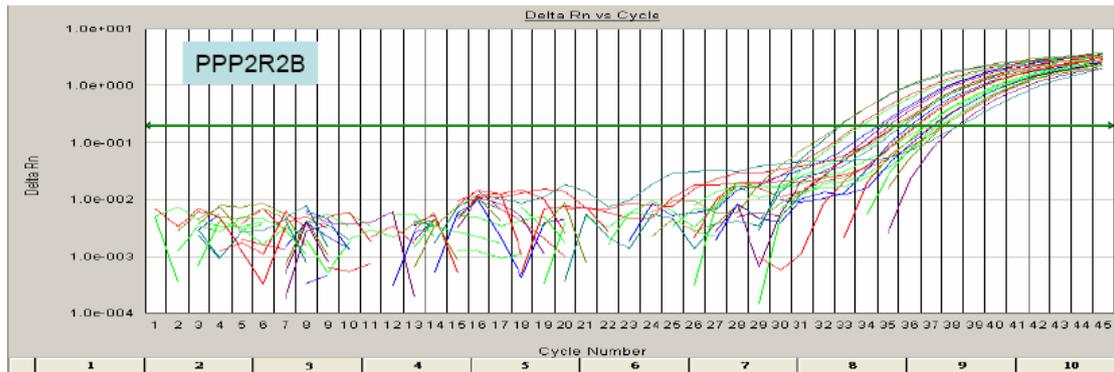


圖七、6 組配對的阿茲海默氏症患者 (P1 ~ P6) 與正常人 (N1 ~ N6) 淋巴細胞株之甲基化 (M) 程度量化圖。上方數字 (1 ~ 8) 表示圖五、圖六中標示的 CpG 位置。全黑的圓圈代表 100% 的甲基化；3/4 黑的圓圈代表 75% 的甲基化；1/2 黑的圓圈代表 50% 的甲基化；1/4 黑的圓圈代表 25% 的甲基化，全白的圓圈代表 0% 的甲基化。

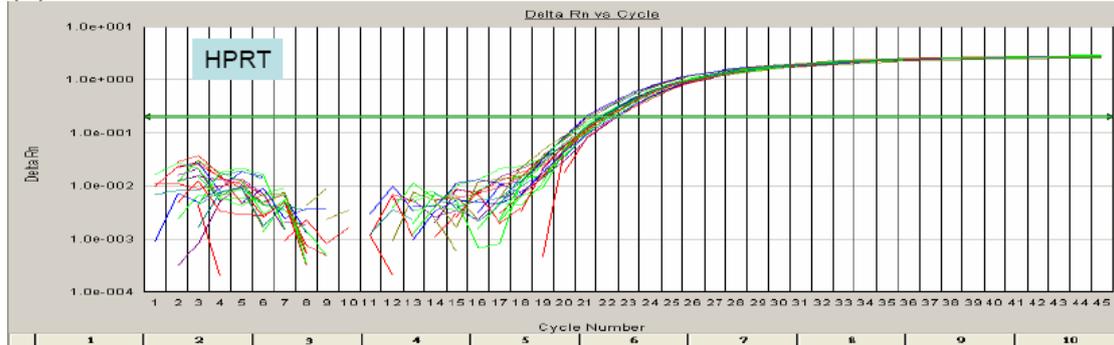


圖八、淋巴細胞株 DNA 的 CHIP-PCR 檢測。(A) (D) 基因組 DNA 經超音波震盪前 (-)、後 (+) 的 0.8% 瓊脂膠體電泳圖。以抗體 anti-dimethyl H3-K9 (B) 或 anti-acetyl H3-K14 (E) 進行 CHIP-PCR 後產物的 0.8% 瓊脂膠體電泳圖，lane P 未經 CHIP 步驟，lane - 未加抗體、但經 CHIP 步驟，lane + 加抗體、且經 CHIP 步驟，PCR 產物大小為 358 bp Bβ1 (+111 ~ +468)、301 bp Bβ2 (-193 ~ +108)，+1 為轉錄起始位置。配對的 3 組阿茲海默氏症患者與正常人 (P2/N2、P4/N4、P5/N5) Bβ1、Bβ2 5' 端區域組蛋白修飾的相對量化圖。

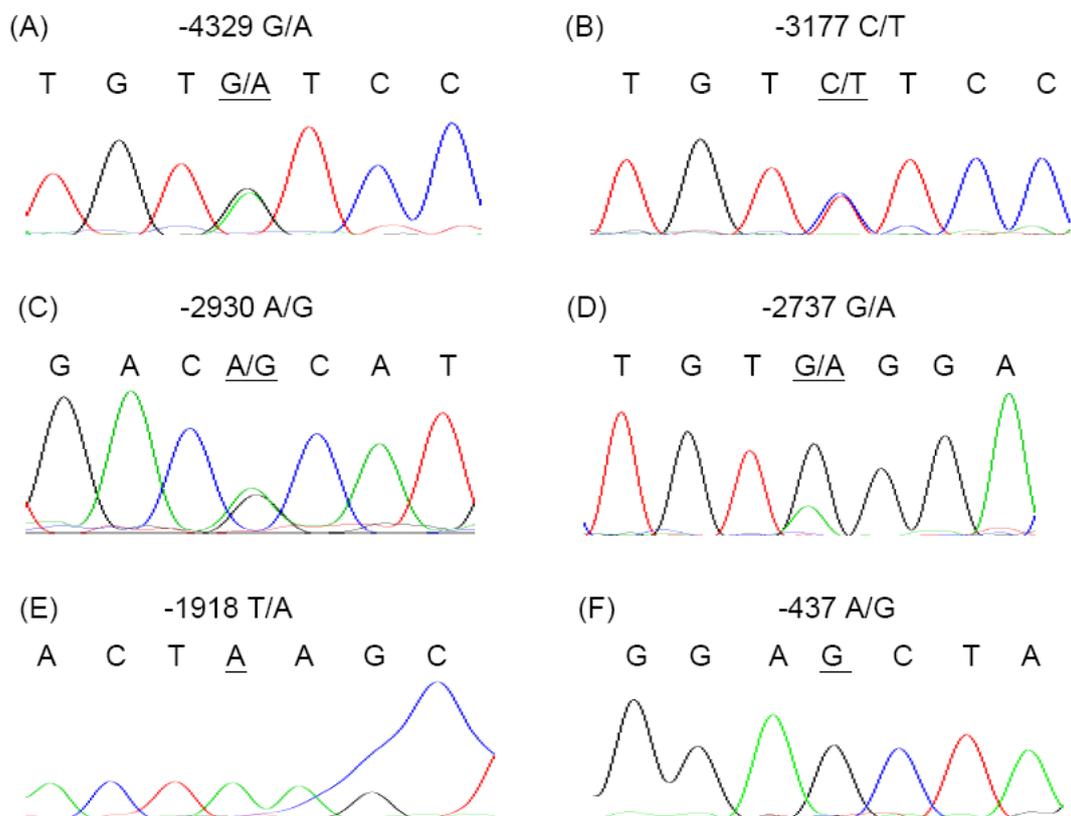
(A)



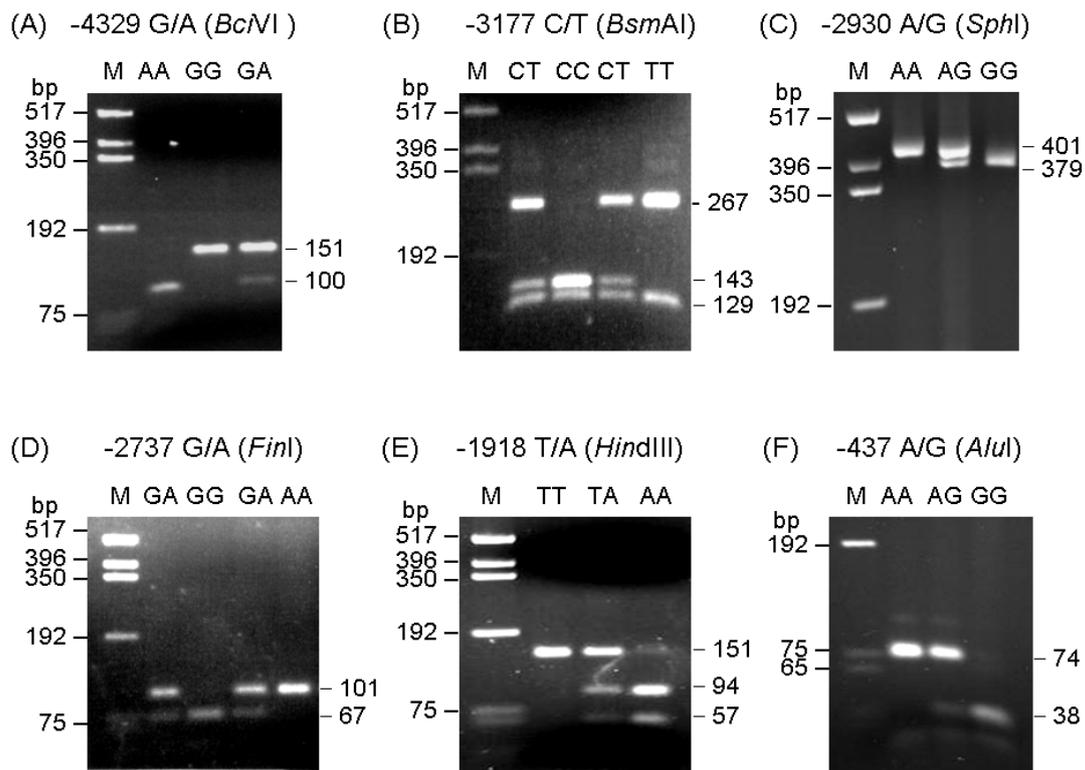
(B)



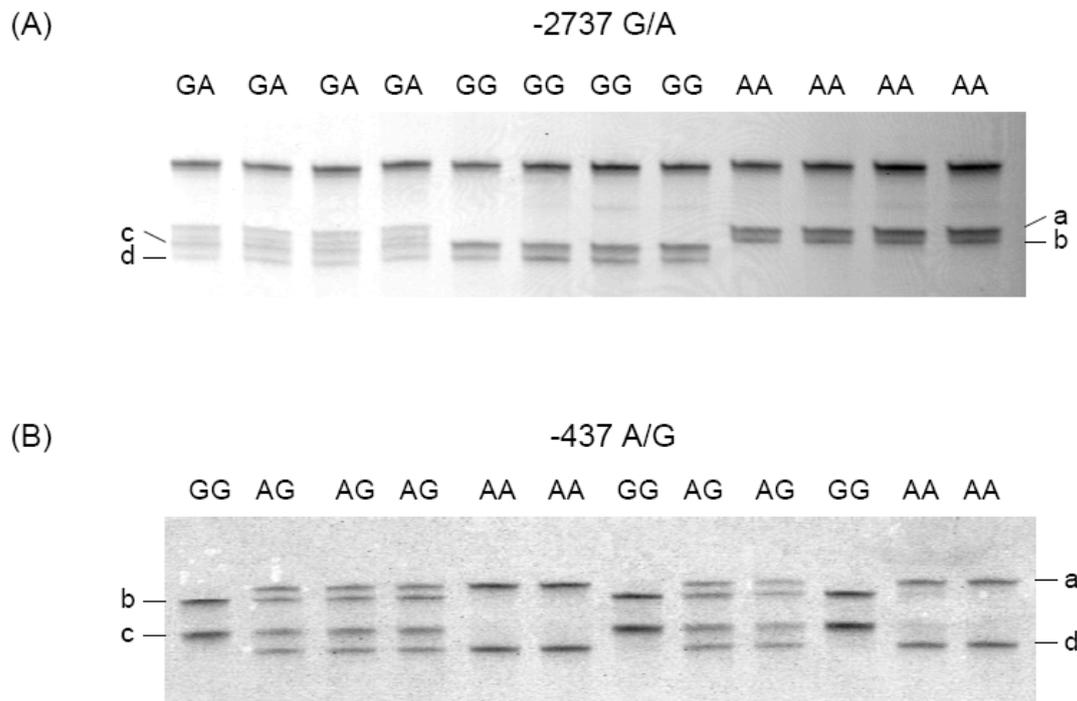
圖九、Real time RT-PCR 檢測淋巴細胞株中 *PPP2R2B* (A)、*HPRT* (B) mRNA 的表現量。



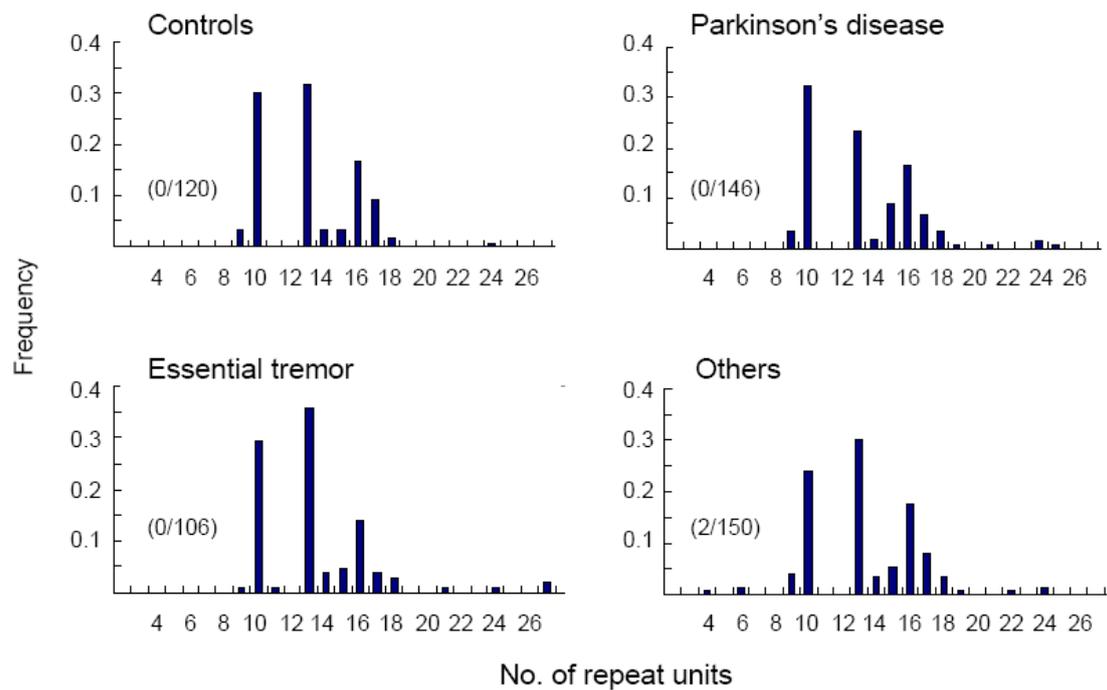
圖十、B $\beta$ 1 基因遠端啓動子多型性的定序圖。(A) -4329 G/A 多型性的異型合子。(B) -3177 C/T 多型性的異型合子。(C) -2930 A/G 多型性的異型合子。(D) -2737 G/A 多型性的異型合子。(E) -1918 T/A 多型性的同型合子。(F) -437 A/G 多型性的同型合子。



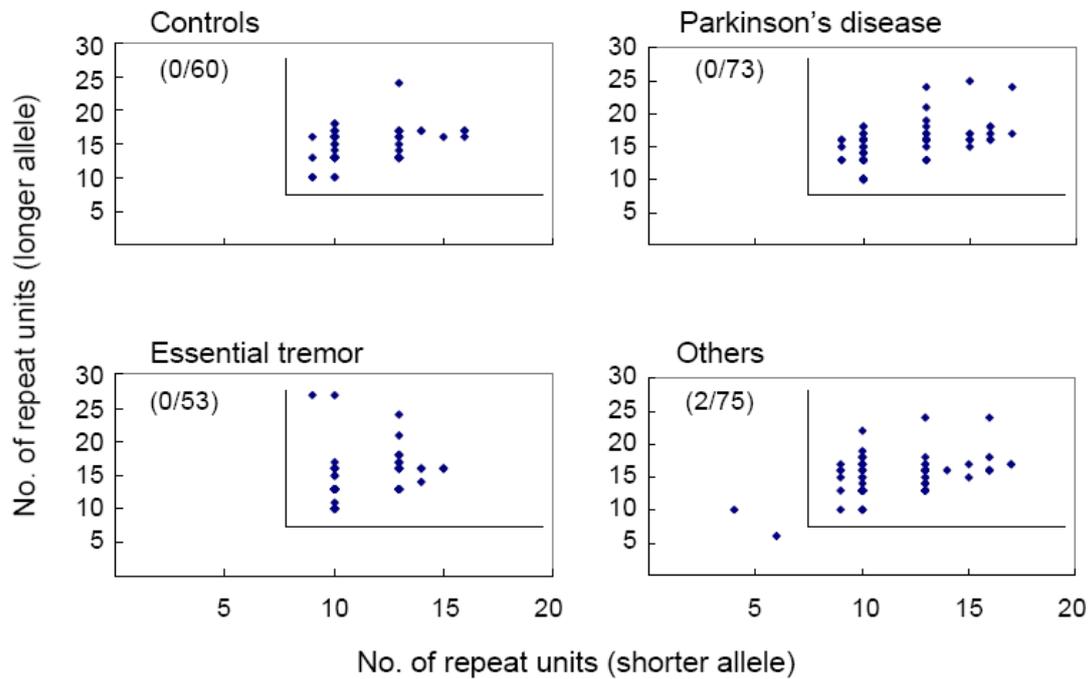
圖十一、B $\beta$ 1 啓動子多型性檢測。(A) -4329 G/A 多型性。GG、GA、AA 各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Bci*VI (GTATCC) 切割、2.0% 洋菜膠體電泳照片。(B) -3177 C/T 多型性。CC、CT、TT 各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Bsm*AI (GTCTC) 切割、2.0% 洋菜膠體電泳照片。(C) -2930 A/G 多型性。AA、AG、GG 各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Sph*I (GCATGC) 切割、1.4% 洋菜膠體電泳照片。(D) -2737 G/A多型性。GG、GA、AA各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Fin*I (GGGAC) 切割、2.0% 洋菜膠體電泳照片。(E) -1918 T/A 多型性。TT、TA、AA各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Hind*III (AAGCTT) 切割、2.0% 洋菜膠體電泳照片。(F) -437 A/G 多型性。AA、AG、GG 各基因型的 DNA 樣品經增幅後的 *Alu*I (AGCT) 切割、2.2% 洋菜膠體電泳照片。



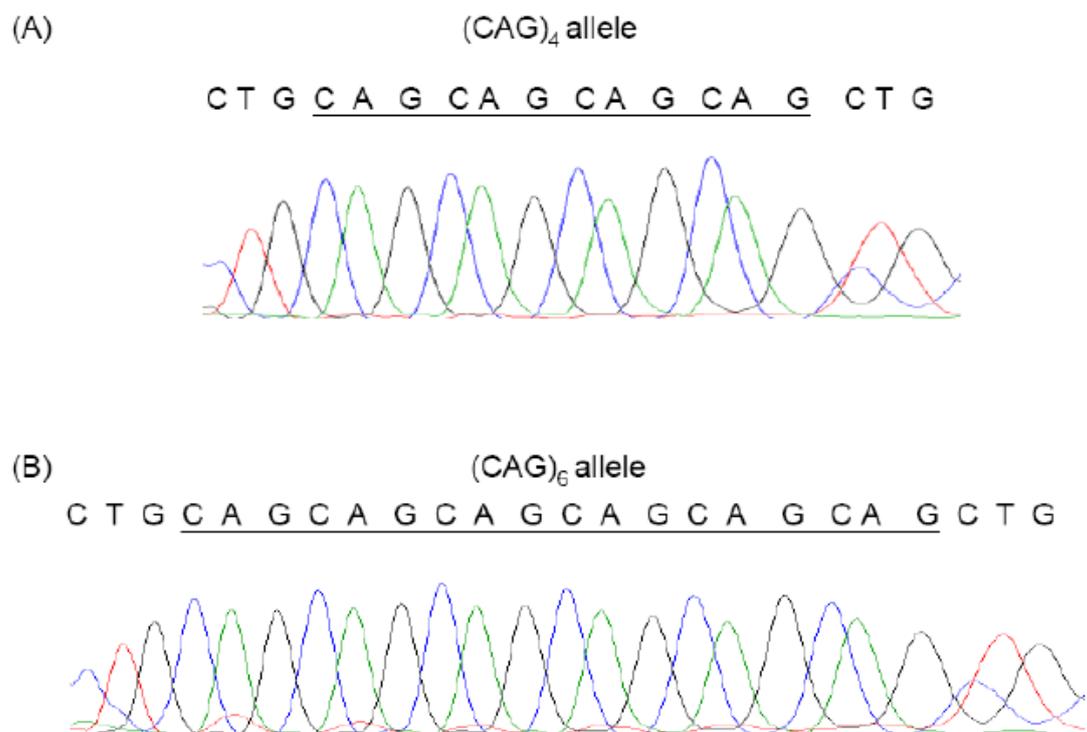
圖十二、B $\beta$ 1 啓動子 -2737 G/A 與 -437 A/G 多型性的 SSCP 分析。(A) -2737 G/A 多型性。G 等位基因的單股構象以 c、d 標示，A 等位基因的單股構象以 a、b 標示。(B) -437 A/G 多型性。A 等位基因的單股構象以 a、d 標示，G 等位基因的單股構象以 b、c 標示。各樣品的多型性基因型標記於上方。



圖十三、B $\beta$ 1 基因啓動子之 CAG 三核苷酸重複次數的等位基因頻率分佈圖。檢測的族群包括正常人 (Controls)、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、原發性顫抖症 (Essential tremor)、舞蹈症和肌張力異常症等其他神經相關疾之患者與其家屬 (Others)。



圖十四、B $\beta$ 1 基因啓動子之 CAG 三核苷酸重複次數多型性基因型分佈圖。檢測的族群包括正常人 (Controls)、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、原發性顫抖症 (Essential tremor)、舞蹈症和肌張力異常症等其他神經相關疾之患者與其家屬 (Others)。



圖十五、二位舞蹈症患者  $B\beta 1$  基因啓動子之  $(CAG)_4$  (A)、 $(CAG)_6$  (B) 等位基因的 DNA 定序圖。

表一、RE-PCR、ChIP-PCR 和 Bisulfite sequencing PCR 之引子對及反應條件

引子對	煉合(°C) / MgCl <sub>2</sub> (mM) / DMSO (%)	片段 (bp)
Bβ1 (+111 ~ +468)		
F: TTTGCATTTTGGAGCGGC	56 / 1.5 / 10	358
R: CTCCCCGCAGCCAGTCT		
Bβ2 (-193 ~ +108)		
F: AGAAACTCACCACACGGGAAA	54.5 / 1.0 / 10	301
R: GGCCTTTTAAGCTGGCTACATC		
Bβ1 promoter (-1974 ~ -1824) (internal control)		
F: ATTCCAACCGAAGGCACAAT	56 / 1.5 / 10	151
R: CGAGGTTCCAACATTCAGTCC		
Bβ1 (+49 ~ +543)		
F: GGGTTTAGAAAGGTATTATTTTGT	63 / 2.5 / 0	495
R: ATCAATATCCTCCTCCATTAACAAC		

註：依據包含 *PPP2R2B* 基因的 NC\_000005 序列，Bβ1 +111 ~ +468、-1974 ~ -1824、+49 ~ +543 片段分別為 202966 ~ 203323、200882 ~ 201032、202904 ~ 203398；Bβ2 -193 ~ +108 片段為 25344 ~ 25644。202856 為 Bβ1 轉錄起始點 (+1)；25537 為 Bβ2 轉錄起始點 (+1)。

表二、B $\beta$ 1 啓動子定序之引子對及反應條件

引子對	煉合 (°C) / MgCl <sub>2</sub> (mM) / DMSO (%)	片段 (bp)
B $\beta$ 1 promoter I (-6718 ~ -3325)		
F: GTGGTTAAGAGCATGGGCTGTAGAG	62 / 2.5 / 0	3394
R: TAATTGGTTCGATTTATTCCTGTATGCATA		
B $\beta$ 1 promoter II (-3486 ~ -536)		
F: GATGGCCTCGATCTCCTGACCTCATAATCT	66 / 2.5 / 0	2951
R: CCTTATATGATGCATGTGGTCCCTTGGTGA		
B $\beta$ 1 promoter III (-879 ~ +23)		
F: ACCTAACGGAGAGGCTGCAA	56 / 1.5 / 10	902
R: ACAGGATTCAGGCTTGCCTGGCC		

註：依據包含 *PPP2R2B* 基因的 NC\_000005 序列，所定序的 B $\beta$ 1 promoter I、II、III 片段分別爲 196138 ~ 199531、199370 ~ 202320、201977 ~ 202878。202856 爲轉錄起始點 (+1)。

表三、增幅 B $\beta$ 1 啓動子多型性片段所用引子對及反應條件

多型性	煉合(°C) / MgCl <sub>2</sub> (mM) / 酵素 DMSO (%) (片段 bp)
-4329 G/A F: GTGTAGGAAGCATTAGCCTAAGGA R: GGCCAATTACAAATACACAGCCT	52 / 2.0 / 10 <i>Bci</i> VI: GT <u>A</u> TCC (151 / 100, 51)
-3177 C/T F: CTTATGAGCTAGAAAATTTCCAGCT R: CCTCCCAGGTTCAAGTGAGT	48 / 1.0 / 0 <i>Bsm</i> AI: GT <u>C</u> TCC (143, 129 / 272)
-2930 A/G F: CTTATGAGCTAGAAAATTTCCAGCT R: CCTCCCAGGTTCAAGTGAGT <u>C</u> GAT	60 / 1.5 / 0 <i>Sph</i> I*: <u>G</u> CATGC (401 / 379, 22)
-2737 G/A F: TCTAGTGAAAATGGCCAACAA R: TTCCGGTGTTTTCTGCCT	56 / 1.0 / 0 <i>Fin</i> I: <u>G</u> GGAC (67, 34 / 101)
-1918 T/A F: ATTCCAACCGAAGGCACAAT R: CGAGGTTCCAACATTCAGTCC	52.5 / 1.0 / 10 <i>Hind</i> III: <u>A</u> AGCTT (151 / 94, 57)
-437 A/G F: GTTCTCAAGTTCAGGCGTCC R: AACCTCCTCCCCTCTCGC	54.5 / 1.0 / 10 <i>Alu</i> I: A <u>G</u> CT (74 / 38, 36)

註：\*以誤配引子 PCR 引入限制酶切位。引子上誤配鹼基及限制酶

辨識切位上多型性鹼基分別以下標橫線標示出。

表四、正常人族群 (255 位) B $\beta$ 1 啓動子多型性之哈溫平衡檢測

	觀察值		預期值		哈溫平衡P
	No.	(%)	No.	(%)	
<b>-4329 G/A</b>					
GG	142	(55.7)	140.1	(54.9)	0.822
GA	94	(36.9)	97.8	(38.4)	
AA	19	(7.5)	17.1	(6.7)	
<b>-3177 C/T</b>					
CC	123	(48.2)	116.7	(45.8)	0.196
CT	99	(38.8)	111.6	(43.8)	
TT	33	(12.9)	26.7	(10.5)	
<b>-2930 A/G</b>					
AA	130	(51.0)	128.5	(50.4)	0.898
AG	102	(40.0)	105.1	(41.2)	
GG	23	(9.0)	21.5	(8.4)	
<b>-2737 G/A</b>					
GG	138	(54.1)	115.3	(45.2)	0.000
GA	67	(26.3)	112.3	(44.0)	
AA	50	(19.6)	27.3	(10.7)	
<b>-1918 T/A</b>					
TT	92	(36.1)	96.1	(37.7)	0.565
TA	129	(50.6)	120.9	(47.4)	
AA	34	(13.3)	38.1	(14.9)	
<b>-437 A/G</b>					
AA	130	(51.0)	128.5	(50.4)	0.898
AG	102	(40.0)	105.1	(41.2)	
GG	23	(9.03)	21.5	(8.4)	

表五、B $\beta$ 1 啓動子多型性的 SNPSpD 連鎖不平衡檢測

	D'					
	-4329 G/A	-3177 C/T	-2930 A/G	-2737 G/A	-1918 T/A	-437 A/G
-4329 G/A	<b>4.02</b>	0.91	0.98	0.99	0.93	0.97
-3177 C/T	0.15	<b>0.99</b>	0.88	0.87	0.85	0.88
$\Delta^2$ -2930 A/G	0.82	0.16	<b>0.66</b>	0.82	0.91	1.00
-2737 G/A	0.67	0.19	0.54	<b>0.23</b>	0.30	0.82
-1918 T/A	0.18	0.21	0.21	0.03	<b>0.08</b>	0.92
-437 A/G	0.81	0.16	0.97	0.53	0.21	<b>0.02</b>

註 1：對角線上爲和 LD correlation matrix 相關的 eigenvalues ( $\lambda$ s) (粗黑、斜體)，分別代表 -4329、-3177、-2930、-2737、-1918、-437 的特徵值；對角線的上方爲 Lewontin's standardized disequilibrium coefficients (D')；對角線的下方爲 squared pairwise correlations ( $\Delta^2$ )。  
(Significance threshold to keep type I error rate at 5% : 0.012)

註 2：樣品數包含 238 位阿茲海默氏症患者、74 位血管性失智症患者及 255 位正常人。

表六、阿茲海默氏症患者 (AD)、血管性失智症患者 (VaD) 及正常人群 (Control) B $\beta$ 1 啓動子多型性的基因型分佈

	<u>AD ( 238 )</u>		<u>VaD ( 74 )</u>		<u>Control ( 255 )</u>	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>-4329 G/A</b>						
GG	126	(52.9)	37	(50.0)	142	(55.7)
GA	97	(40.8)	32	(43.2)	94	(36.9)
AA	15	(6.3)	5	(6.8)	19	(7.5)
Locus total P		0.642		0.610		
<b>-3177 C/T</b>						
CC	99	(41.6)	36	(48.6)	123	(48.2)
CT	117	(49.2)	31	(41.9)	99	(38.8)
TT	22	(9.2)	7	(9.5)	33	(12.9)
Locus total P		0.057		0.701		
<b>-2930 A/G</b>						
AA	115	(48.3)	36	(48.6)	130	(51.0)
AG	100	(42.0)	32	(43.2)	102	(40.0)
GG	23	(9.7)	6	(8.1)	23	(9.0)
Locus total P		0.838		0.876		
<b>-2737 G/A</b>						
GG	122	(51.3)	37	(50.0)	138	(54.1)
GA	64	(26.9)	16	(21.6)	67	(26.3)
AA	52	(21.8)	21	(28.4)	50	(19.6)
Locus total P		0.776		0.257		
<b>-1918 T/A</b>						
TT	98	(41.2)	33	(44.6)	92	(36.1)
TA	109	(45.8)	30	(40.5)	129	(50.6)
AA	31	(13.0)	11	(14.9)	34	(13.3)
Locus total P		0.233		0.122		
<b>-437 A/G</b>						
AA	118	(49.6)	37	(50.0)	130	(51.0)
AG	98	(41.2)	32	(43.2)	102	(40.0)
GG	22	(9.2)	5	(6.8)	23	(9.0)
Locus total P		0.756		0.478		

表七、阿茲海默氏症患者 (AD)、血管性失智症患者 (VaD) 及正常人群 (Control) B $\beta$ 1 啓動子多型性的等位基因頻率

	<u>AD ( 238 )</u>		<u>VaD ( 74 )</u>		<u>Control ( 255 )</u>	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>-4329 G/A</b>						
G	349	(73.3)	106	(71.6)	378	(74.1)
A	127	(26.7)	42	(28.4)	132	(25.9)
Locus total P		0.776		0.544		
<b>-3177 C/T</b>						
C	315	(66.2)	103	(69.6)	345	(67.6)
T	161	(33.8)	45	(30.4)	165	(32.4)
Locus total P		0.623		0.655		
<b>-2930 A/G</b>						
A	330	(69.3)	104	(70.3)	362	(71.0)
G	146	(30.7)	44	(29.7)	148	(29.0)
Locus total P		0.571		0.867		
<b>-2737 G/A</b>						
G	308	(64.7)	90	(60.8)	343	(67.3)
A	168	(35.3)	58	(39.2)	167	(32.7)
Locus total P		0.398		0.146		
<b>-1918 T/A</b>						
T	305	(64.1)	96	(64.9)	313	(61.4)
A	171	(35.9)	52	(35.1)	197	(38.6)
Locus total P		0.381		0.441		
<b>-437 A/G</b>						
A	334	(70.2)	106	(71.6)	362	(71.0)
G	142	(29.8)	42	(28.4)	148	(29.0)
Locus total P		0.780		0.880		

表八、阿茲海默氏症患者 (AD)、血管性失智症患者 (VaD) 及正常人群 (Control) B $\beta$ 1 啓動子的多型性單套型頻率

單套型	AD ( 476 )		VaD ( 148 )		Control ( 510 )	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
-4329/-3177/-2930/-2737/-1918/-437						
010000	145.3	(30.5)	41.9	(28.3)	151.7	(29.3)
000000	14.1	(3.0)	8.1	(5.5)	14.7	(2.9)
000010	124.9	(26.2)	35.9	(24.3)	153.6	(30.1)
000011	0.5	(0.1)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
000100	1.4	(0.3)	1.0	(0.7)	3.0	(0.6)
000110	32.6	(6.9)	14.1	(9.7)	29.0	(5.7)
001001	12.6	(2.6)	2.0	(1.4)	17.0	(3.3)
001010	0.7	(0.1)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
001101	3.0	(0.6)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
001110	1.0	(0.2)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
010001	0.5	(0.1)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
010010	9.6	(2.0)	1.1	(0.7)	4.9	(1.0)
010100	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	0.4	(0.1)
010110	0.0	(0.0)	0.5	(0.4)	2.6	(0.5)
011000	1.3	(0.3)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)
011001	1.4	(0.3)	1.0	(0.7)	1.1	(0.2)
100100	1.0	(0.2)	1.0	(0.7)	2.1	(0.4)
101001	1.0	(0.2)	0.0	(0.0)	1.0	(0.2)
101100	1.9	(0.4)	2.0	(1.4)	0.0	(0.0)
101101	118.5	(24.9)	38.5	(26.0)	118.2	(23.2)
101111	1.7	(0.4)	0.1	(0.0)	6.4	(1.3)
111101	2.9	(0.6)	0.5	(0.3)	3.8	(0.7)
111111	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	0.5	(0.1)

註：單套型中 0 表示常見的等位基因、1 表示多型性的等位基因。

表九、B $\beta$ 1 基因 CAG 三核苷重複等位基因的頻率分佈

CAG no.	Controls		PD		Tremor		Others	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<b>4</b>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	<b>0.7</b>
<b>6</b>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	<b>1.4</b>
9	4	3.4	3	2.4	1	1.0	6	4.3
<b>10</b>	35	<b>30.2</b>	37	<b>29.8</b>	29	<b>28.4</b>	34	<b>24.3</b>
11	0	0.0	0	0.0	1	1.0	0	0.0
<b>13</b>	36	<b>31.0</b>	28	<b>22.6</b>	37	<b>36.3</b>	40	<b>28.6</b>
14	4	3.4	2	1.6	4	3.9	5	3.6
15	4	3.4	12	9.7	5	4.9	8	5.7
<b>16</b>	19	<b>16.4</b>	24	<b>19.4</b>	15	<b>14.7</b>	26	<b>18.6</b>
17	11	9.5	8	6.5	4	3.9	10	7.1
18	2	1.7	5	4.0	2	2.0	4	2.9
19	0	0.0	1	0.8	0	0.0	1	0.7
21	0	0.0	1	0.8	1	1.0	0	0.0
22	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.7
24	1	0.9	2	1.6	1	1.0	2	1.4
25	0	0.0	1	0.8	0	0.0	0	0.0
27	0	0.0	0	0.0	2	2.0	0	0.0
Total	116		124		102		140	
Mean	13.1		13.6		13.4		13.3	
Std	2.8		3.2		3.3		3.2	