突變型超氧化物岐化酵素 Cu,Zn-SOD 引發神經細胞死亡誘發運動神經元疾病 ALS 之分子致病機制探討

The Molecular Action Mechanism of Human Cu,Zn-SOD Gene Deficiency-induced Cell Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis

中文摘要

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) 是一種進行性運動神經肌肉萎縮症，屬於運動神經元疾病(MND)的一種，目前病因不明，臨床上尚無有效治療藥物。而在 FALS 病人的 sod1 基因上，已發現約有 50 種點突變。推測 ALS 病因可能是:由於人體內 sod1 基因發生點突變使體內產生過量的自由基 hydroxyl radical(•OH)無法獲得清除，進而攻擊神經細胞造成細胞走向 apoptosis 死亡。apoptosis 是造成 ALS 病人運動神經受傷萎縮的主因。因此我們探討突變型 sod1 基因引起神經細胞死亡誘發運動神經元疾病 ALS 之致病機制。

為進一步篩檢台灣本土型 FALS 病例，探討台灣本土型 FALS 病例是否與日本及歐美的病例一般發生 sod1 基因點突變，設計了 5 對 PCR 引子，深入分析台灣本土型 FALS 病例 sod1 基因所發生變異的位置。

利用 RT-PCR 的技術從人類肝臟組織 cDNA 中選殖出存在人類體內的抗氧化酵素: Cu,Zn-SOD 並以大腸桿菌 E. coli 進行蛋白質基因工程的表現及其多株抗體的製備，成功的選殖出抗氧化酵素基因，表現出具有活性約 1335 (Unit/mg) 的蛋白質。此外利用 site-direct mutagenesis PCR 構築出三個未曾分析過帶有點突變的 sod1 基因 E21K、D90V 和 D101G，選擇大腸菌基因表現系統製備出這些變異型重組蛋白質，結果顯示他們的活性下降分別只剩至 52% 、56% 、38% ，在 in vitro 上相似於病人來證明其體內酵素活性的改變與差異。

PC12 細胞為神經疾病方面良好的細胞實驗模式，為探討變異的 sod1 基因與 ALS 相關性，目前我們成功新建立了 SOD1-transduction delivery protein 系統，超越傳統 transfection 技術的缺點,可以定量將正常或變異型的蛋白質直接準確的送入 PC 12 細胞。以免疫螢光染色法定性觀察到 denature Tat-SOD1 明顯被攜帶入細胞，而且隨著時間的增加 SOD1 蛋白的存在量也跟著增加 ，更重要的是也觀察到酵素活性的增加發揮所扮演的生理活性功能。

進一步探討神經細胞透過 apoptosis 的死亡機制，在細胞培養液中給與一個已知的 superoxide anion 產生物 70mM Paraquat，使其對 PC12 細胞產生攻擊引起死亡。細胞存活度約為 18% 。 隨著 Tat-SOD1、Tat-E21K 和 D101G 不同蛋白的加入，他們的存活度分別增加為 33% (Tat-SOD1)、29% (Tat-E21K)，在 DNA fragmentation 中細胞所出現的斷裂情形有明顯差異，顯示他們可以保護細胞免於走向死亡;然而加入 Tat-D101G 細胞的存活度卻下

降爲 6% ，出現特別顯著促進細胞死亡的情形。隨著人類基因的解碼及後基因體時代的來臨，我們更希望藉由 transduction delivery protein 系統進行研究，相信必定可以達到 protein therapy 的目標。

英文摘要

The most frequent genetic causes of amylotrophic lateral sclerosis (ALS) determined so far are mutations occurring in the gene coding for copper/zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD).The mechanism may involve the formation of hydroxyl radicals or malfunctioning of the SOD protein. We found that sequence of genomic sod1 gene from a sporadic ALS patient has two point mutations.In order to investigate the possible roles on genetic causes of ALS, SOD cDNA and mutants were constructed and transduced into PC12 cell to observe the cellular consequences.

RT-PCR from human liver extract generated the SOD gene (sod1). Wild-type sod1 was constructed into a transcription-translation expression vector to examine the SOD1 production in vitro. Wild-type SOD1 was highly expressed in Sf-9 cells infected by Baculovirus and in E. coli. Active SOD1 was expressed by IPTG induction and in a metal-dependent matter.SDS-PAGE and Western blot analysis illustrated a 23kDa monomer product.To study the cellular effect of SOD1, Tat-tag was used as a cellular transduction delivery vehicle.

Denatured Tat-sod1 was observed to be successfully transduced into undifferentiated PC12 or differentiated PC12 neural cells and retained its activity via protein refolding. Site-directed mutagenesis created a genetic deficiency in tat-tag wild-type with three point mutations as E21K, D90V and D101G. Tat-tag mutants expressed in E. coli completely lost SOD activity.In undifferentiated PC12 cells, Tat-SOD avoided DNA fragmentation from superoxide attack generated by 70mM paraquat; however, mutant Tat-D101G enhanced cell death.