

國立臺灣大學醫學院生理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Physiology
College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

調控 *CYP11A1* 啟動子於小鼠

嗅覺上皮細胞表現之序列分析

**Characterization of the DNA elements that regulate
the expression of *CYP11A1* promoter in mouse
olfactory epithelium**

梁凱豪

Kai-Hao Liang

指導教授：胡孟君博士

Advisor: Meng-Chun Hu, Ph.D.

中華民國 101 年 10 月

October 2012

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

調控 *CYP11A1* 啟動子於小鼠嗅覺上皮細胞
表現之序列分析

Characterization of the DNA elements that regulate the expression
of *CYP11A1* promoter in mouse olfactory epithelium

本論文係梁凱豪君 (R99441001) 在國立臺灣大學醫學院生理學
研究所完成之碩士學位論文，於民國一百零一年十月九日承下列考試
委員審查通過及口試及格，特此證明

論文指導教授： 胡益君

口試委員： 孫錦忠

盧立鈺

徐立中

生理學研究所所長： 楊志永

致謝

感謝胡老師在這兩年中不斷地灌輸教育我們作為研究者應有的觀念、實驗上的知識以及表達上的技巧，並能夠容忍我不時的出錯，我真的非常感謝您的指導。也謝謝口試委員孫錦虹老師、盧主欽老師以及徐立中老師對我的論文以及實驗內容給予許多指點與教導，使我能令此論文更臻完善。

終於，人生又要邁向另一個階段，脫離學生身分了。在這段碩士生涯裡我遇到了許多不曾遇過的挫折，考試被當、做了半年的論文題目中止、新題目卡了好幾個月沒有進展、口試前筆電故障，入伍前一週我還沒印完論文…一路過來有許多不同的考驗，每一次都是令人成長的機會。在這兩年又四個月的生活裡我學到很多事情未必能盡人意，當事情無法如你想像般進行時，必定帶給你許多煩惱與不安。但是我很感謝我這段時間陪在我身邊的人們，從胡老師到學長姐、同學、學弟妹，有你們的陪伴給予我往下走的勇氣，而度過了這些令你煩惱讓你擔憂的事情後，往回一看其實很多事情都是這麼無關輕重，當初它在你心裡占了這麼大的分量此時一看卻覺得它渺小的可笑。我誠摯希望這些經驗與心得可以延續並應用到我未來的人生。

實驗室的大家對我而言也都是不可取代的存在。豐名學長像個大哥一樣又沒有學長的架子，不管是做實驗還是跟我們分享自己的經驗都對我碩士的生活有莫大的助益。阿財也是非常棒的學長，幫助我在我不熟悉的實驗中能夠迅速抓到要領，而且越來越有豐名學長的風範，將來一定是實驗室的重要支柱。芮甄與姿萱兩位動物實驗的前輩是我這個沒有動物實驗經驗的菜鳥從無到有最重要的老師，也是實驗室中製造笑料的重要來源，尤其是芮甄，從我剛推上生理所到我畢業一直在旁邊不斷地指導同時不斷地欺壓(?)我，真是很有趣的學姐。育賢在這兩年也與我一起度過許多風風雨雨，熬過了這兩年多的作戰夥伴，是個堅毅不屈的猛男，也有許多值得我學習的優點。閔茹跟浩華兩位學妹一動一靜，個性互補

但又都善體人意，很開心能有這兩位可愛的學妹。裕方與思穎兩個小小學弟與學妹也都隨和好相處，很高興他們的加入。希望 1024 實驗室的大家都可以保持愉悅的實驗室氣氛，共同維護這個大家庭。

當然，除了實驗室的夥伴以外我也很感謝其他的好朋友、學長姐與學弟妹們。認識他們是我覺得在這段時間中最大最大的收穫。蘇老師家的我的好朋友們：聖夏既聊得來又時常給予我很有用的人生建議以及想法，哲銘常常讓我欺負一下抒發壓力，靖雅雖然大了我一歲…阿不是，很細心也很體貼，還時常為我分擔一些心理的壓力，我真的沒想到已經到了研究所還能在交到這麼要好的朋友們，謝謝你們，也希望以後能繼續保持聯絡。曉君學姊的關愛、開導也是支撐我走下去的動力之一，而活潑的喻如、有趣的碩珏還有很多很多的學長姐、同學以及學弟妹，我也很感謝你們帶給我許多生活上的樂趣，在這稍微苦悶的研究生涯中增添不少色彩。

最後也感謝我的家人，雖然我選了一條走起來不輕鬆，未來發展沒那麼好的路，仍無怨無尤的支持我，沒有你們不會有今天的我，真的謝謝你們，老爸老媽與老姐，謝謝！希望在接下來的人生旅途中，我可以找到一條屬於我的道路，穩穩的走下去。

目錄

圖次.....	3
表次.....	3
摘要.....	4
Abstract.....	6
第一章 導論.....	7
一、類固醇荷爾蒙 (steroid hormone).....	7
二、神經類固醇 (neurosteroid).....	7
1. 神經類固醇之發現.....	7
2. 神經類固醇之功能.....	8
三、 <i>CYP11A1</i> 基因特性.....	9
1. <i>CYP11A1</i> 基因的表現分布.....	9
2. 人類 <i>CYP11A1</i> 啟動子於典型類固醇生成組織的調控.....	10
3. <i>CYP11A1</i> 啟動子於腦部的調控.....	10
四、Cre-loxP 系統.....	11
五、研究目的.....	12
第二章 材料與方法.....	14
一、凝膠遷移 (Electrophoresis mobility shift assay, EMSA).....	14
二、西方墨點法.....	17
三、質體.....	18
四、視網膜組織原代培養.....	19
五、視網膜電穿孔轉染法.....	22
六、小鼠視網膜組織 X-gal 酵素活性染色.....	22
第三章 結果.....	24
一、嗅覺上皮細胞內具有可與 <i>CYP11A1</i> 啟動子序列結合之分子.....	24
1. 嗅覺上皮組織細胞核蛋白質萃取.....	24
2. <i>CYP11A1</i> 啟動子序列-3.5 kb 與-3.2 kb 間有潛在調控因子.....	24
3. -3447 至-3391 序列 (2 號探針) 之 EMSA 分析.....	25
4. -3400 至-3346 序列 (3 號探針) 之 EMSA 分析.....	25
5. -3305 至-3247 序列 (5 號探針) 之 EMSA 分析.....	27
二、建立視網膜電穿孔轉染法進行體外基因轉入.....	28
1. 視網膜電穿孔轉染法可成功轉入外來基因.....	28
2. <i>CYP11A1</i> 啟動子轉入視網膜組織之表現.....	29

第四章 討論.....	30
一、 <i>CYP11A1</i> 啟動子-3400 與-3346 (3 號探針) 間序列之分析結果.....	30
二、 <i>CYP11A1</i> 啟動子-3305 與-3247 間序列 (5 號探針) 之分析結果.....	33
三、體外轉殖方式之建立.....	34
四、未來可進行之實驗.....	34
參考文獻.....	36



圖次

圖一、嗅覺上皮組織細胞核蛋白質萃取之分析.....	42
圖二、CYP11A1 啟動子-3.5k 與-3.2k 間之 DNA 序列 EMSA 分析.....	43
圖三、CYP11A1 啟動子-3447 與-3391 間之 DNA 序列 EMSA 反應.....	44
圖四、CYP11A1 啟動子-3400 與-3346 間之 DNA 序列 EMSA 反應.....	45
圖五、CYP11A1 啟動子-3400 與-3346 間分段之 DNA 序列 EMSA 反應.....	46
圖六、CYP11A1 啟動子-3400 與-3346 間序列經定點突變後之 EMSA 反應.....	47
圖七、CYP11A1 啟動子-3305 與-3247 間之 DNA 序列 EMSA 反應.....	48
圖八、CYP11A1 啟動子-3305 與-3247 間分段之 DNA 序列 EMSA 反應.....	49
圖九、CYP11A1 啟動子-3305 與-3247 間序列經定點突變後之 EMSA 反應.....	50
圖十、視網膜電穿孔轉染法之建立.....	51
圖十一、視網膜電穿孔轉染法分析 CYP11A1 啟動子之活性.....	52
圖十二、CYP11A1 啟動子之轉錄因子結合位預測.....	53

表次

表一、視網膜電穿孔轉染法之測試.....	54
----------------------	----

摘要

目前已證實許多類固醇荷爾蒙除了會在腎上腺、性腺與胎盤等處合成外，於中樞神經系統中也可以自行生成類固醇荷爾蒙，這些神經性類固醇荷爾蒙與許多神經生理功能相關，如神經細胞的凋亡、髓鞘的形成、影響記憶與學習的過程還有情緒的產生等。類固醇荷爾蒙以膽固醇 (cholesterone) 做為原料，經細胞色素 P450 膽固醇側鏈截切酶 (cytochrome P450 side chain cleavage, P450scc) 轉換成孕烯醇酮 (pregnenolone)，此步驟為整個類固醇生成步驟之第一步，同時也是速率決定步驟。因此，可表現 P450scc 的 *CYP11A1* 其調控機轉在類固醇荷爾蒙的生成以至於類固醇荷爾蒙所影響的生理功能中具有重大的意義。*CYP11A1* 在一般類固醇荷爾蒙生成組織的調控已經被詳細探討，但在腦中卻因表現量低，其表現分布以及轉錄調控機制目前仍不清楚。本實驗室過去利用基因轉殖小鼠模式說明 4.4 kb 長之 *CYP11A1* 啟動子在腦中具有轉錄活性，更發現在 3.3 kb 左右之 300 bp 的序列決定了 *CYP11A1* 啟動子是否可以驅動報導基因在間腦、中腦以及嗅覺上皮細胞等腦區表現，因此我們判斷該段序列與 *CYP11A1* 啟動子的腦部調控有關。為了釐清這段啟動子範圍可能含有的調控序列，本論文將此 300 bp 分成數段，與小鼠嗅覺上皮細胞核蛋白質萃取物進行凝膠遷移 (electrophoresis mobility shift assay, EMSA) 反應，期望能找到可與核蛋白質反應的結合位。結果發現嗅覺上皮細胞之細胞核萃取液，至少有四種分子可辨識此段序列，具專一性之結合。顯示這些序列對 *CYP11A1* 啟動子於神經系統之轉錄調控可能具有相當的重要性。

以基因轉殖小鼠模式研究啟動子的調控耗時費力，因此我們想建立一套有效率的體外 (in vitro) 基因轉入系統，可驗證 EMSA 的結果。因此我建立了視網膜電穿孔轉染系統，測試啟動子在視網膜上的轉錄活性。當轉入 CMV 啟動子可成功驅動報導基因表現於視網膜組織，但轉入 *CYP11A1* 啟動子無法觀察到報導基

因的表現，說明 CYP11A1 啟動子轉錄活性過低，無法利用體外視網膜培養系統偵測其活性。



Abstract

Steroid hormones are mainly synthesized in adrenal cortex, gonads and placenta. Recent studies indicate that they are also produced in CNS. These so-called neurosteroids do affect physiological functions including neural survival, myelination, neurogenesis, etc. *CYP11A1* encodes P450_{scc} (cytochrome P450 side chain cleavage), which catalyzes the first and the rate-limiting step during steroidogenesis that changes cholesterol into pregnenolone. Thus, *CYP11A1* plays an important part in steroidogenesis. *CYP11A1* can be expressed in steroidogenic tissue, but at low level in brain. This makes *CYP11A1* difficult to be detected and studied in brain. We tried to investigate the regulation and distribution of *CYP11A1* by transgenic mice and proved that 4.4 kb length of *CYP11A1* promoter is able to promote Cre recombinase expression in brain. Furthermore, we have curtailed the range which may contain the potential DNA elements in *CYP11A1* promoter. In this thesis, we spliced the potential regulatory sequence into short segments and incubated them with mouse olfactory epithelium nuclear extracts for electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Our results indicate that the binding sequences of olfactory epithelium nuclear molecules do exist in *CYP11A1* promoter and may play important roles in its neural regulation.

Since using transgenic mice for promoter research costs time and money, we are looking for some other in vitro transgenic system. Therefore, we constructed the retina electroporation system. We sent *CYP11A1* promoter with Cre recombinase as the reporter gene in to retina tissue dissociated from mice cub. The results showed that although the retina electroporation system is able to transfect plasmids in to retina tissue, it still cannot help the weak promoter to trigger the reporter gene expression. In summary, this system is suitable for promoter studies except *CYP11A1* promoter.

第一章 導論

一、類固醇荷爾蒙 (steroid hormone)

類固醇荷爾蒙 (steroid hormone) 是以膽固醇 (cholesterol) 為原料，經由不同類固醇生成酵素催化而生成之脂溶性荷爾蒙 (Baulieu, 1998)，主要可分成三種：糖皮質固醇 (glucocorticoid)、礦物皮質固醇 (minercorticoid) 與性荷爾蒙 (sex hormone)。這些荷爾蒙的合成大部分來自腎上腺、性腺與胎盤，可以調控許多生理功能如代謝、鹽類與水分平衡、性別分化、發育以及生殖等 (Guo et al., 2003; Miller, 1988)。類固醇荷爾蒙生成的第一步驟為膽固醇透過粒線體內膜上的細胞色素 P450 側鏈截切酶 (Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, P450scc) 催化轉變成孕烯醇酮 (pregnenolone, PREG) (Shih et al., 2011)，由於此步驟為類固醇生成過程之速率決定步驟，因此 P450scc 酵素於體內類固醇荷爾蒙的生成過程中扮演重要的角色 (Baulieu, 1998; Miller, 2002)。

二、神經類固醇 (neurosteroid)

1. 神經類固醇之發現

1998 年 Baulieu 團隊發現，大鼠在摘除腎上腺與性腺後，腦內 PREG 與性荷爾蒙前驅物脫氫表雄甾酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 及其衍生物之含量並沒有改變；同時也利用放射性標定之 DHEA 與 PREG 發現其血液中類固醇化合物之量較腦部為少 (Baulieu, 1998)，顯示腦部可能會自行生成類固醇荷爾蒙。其他實驗也證明神經系統會生成數種類固醇及其衍生物，例如：PREG、PREGS、DHEA、DHEAS、progesterone (PROG)、allopregnanolone (Allo) 等 (Charalampopoulos et al., 2008; Garcia-Segura and Melcangi, 2006)。也有文獻指出，大鼠之神經系統如後腦 (hindbrain)、脊髓、神經細胞或神經膠細胞等處可表現 P450scc、P450c17 與 3 β -HSD

等類固醇生成酵素 (Compagnone et al., 1995; Kibaly et al., 2005; Mellon and Griffin, 2002; Mellon et al., 2001; Mukai et al., 2006; Stromstedt and Waterman, 1995)。這些結果都說明神經系統自身可以生合成所需的類固醇荷爾蒙。為了與來自腎上腺、性腺之典型類固醇荷爾蒙有所區分，這些於神經系統中生成的類固醇荷爾蒙被稱為「神經類固醇」 (neurosteroid)。

2. 神經類固醇之功能

典型類固醇荷爾蒙主要與細胞內受器結合再進入細胞核中 (genomic pathway) 影響細胞之基因表現 (Falkenstein et al., 2000) 進行調控。然而神經類固醇荷爾蒙除了此路徑外，還能以其他方式作用於細胞。1986 年 Majewska 團隊證明 PROG 及 deoxycorticosterone 在一定濃度範圍內可以抑制 t-butylbicyclophosphorothionate (為 GABA 受器之抑制性受質) 與 γ -aminobutyric acid (GABA) 受器的結合，同時提升氯離子的通透性達到降低神經興奮活性的效果 (Majewska et al., 1986)；此外，神經類固醇之衍生物 alphaxalone 對 GABA 受器有類似於 pentobarbitone 的作用，具有麻醉的功能 (Harrison and Simmonds, 1984)。硫化態 PREG 則可刺激脊索神經元細胞之 N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受器開啟而具有興奮性的效果 (Wu et al., 1991)。而前人研究也指出，神經類固醇可透過自分泌 (autocrine)、旁分泌 (paracrine) 等方式對神經系統進行調控 (Schumacher et al., 2004)，這些結果顯示神經類固醇荷爾蒙除了透過血液循環遵循一般類固醇荷爾蒙作用途徑外，還可在分泌後結合神經傳導物質之受器，不進入細胞核內 (nongenomic pathway) 而於極短時間內引發本身或附近細胞反應，並影響神經系統的相關功能。

目前研究發現，神經類固醇荷爾蒙之功能包括促進神經細胞新生 (neurogenesis) 與分化 (differentiation) (Compagnone and Mellon, 1998)、神經髓鞘之生成 (myelination) (Koenig et al., 1995) 以及影響神經細胞之存活與凋亡等 (Charalampopoulos et al., 2008; Schumacher et al., 2008)。而人類以及動物實驗則發現

神經性類固醇與某些情緒產生及行為如壓力、焦慮、學習與記憶都有關聯 (Compagnone and Mellon, 2000; Dubrovsky, 2006)。

三、*CYP11A1* 基因特性

1. *CYP11A1* 基因的表現分布

CYP11A1 基因經轉錄轉譯作用後可表現催化類固醇荷爾蒙生成第一步驟之酵素 P450_{scc}。該基因會大量表現於類固醇生成組織腎上腺、性腺、胎盤等處 (Ben-Zimra et al., 2002; Guo et al., 2003; Hu et al., 1999)，此外在皮膚以及小腸當中也發現少量的表現 (Guo et al., 2003; Slominski et al., 1996)。

利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) 以及原位雜合技術偵測，發現 *CYP11A1* mRNA 廣泛存在腦中，包括大腦皮質、小腦、間腦、中腦以及腦幹等處 (Kohchi et al., 1998; Mellon and Deschepper, 1993; Sanne and Krueger, 1995; Stromstedt and Waterman, 1995)；而在大鼠神經膠細胞之原代培養實驗結果顯示其具有 P450_{scc} 酵素之活性，可將 cholesterol 轉為 pregnenolone (Hu et al., 1989)。這些結果都暗示 *CYP11A1* 也可於神經系統中表現。

免疫染色法偵測結果發現，在下視丘視前區、腦下垂體前葉、小腦、視網膜、海馬迴等處可以表現 P450_{scc} (Compagnone et al., 1995; Guarneri et al., 1994; Kimoto et al., 2001; Ukena et al., 1998)。由於 RT-PCR 可以放大微弱的 mRNA 訊號，相較於免疫染色法只能忠實地反應出組織內實際的蛋白質表現量，兩種實驗的結果可能因此產生差異，也顯示腦部可能會廣泛表現 *CYP11A1* mRNA，但是在不同腦區中 P450_{scc} 的表現量以及免疫染色法偵測之訊號強度是相異的。而以 RT-PCR 分析比較不同組織間 *CYP11A1* 表現程度時，發現腦部之 *CYP11A1* mRNA 表現量相對較少，只有腎上腺及性腺的百分之一至千分之一 (Chiang et al., 2011; Mellon and Deschepper, 1993; Sanne and Krueger, 1995)。因腦中過低的表現量，使

得 *CYP11A1* 在神經系統的相關研究較腎上腺、性腺以及胎盤等組織難以進行。

2. 人類 *CYP11A1* 啟動子於典型類固醇生成組織的調控

目前對於 *CYP11A1* 啟動子的研究顯示，在近端-130 bp 以內有一基本調控序列，這段序列包含了 TATA box、Sp1 (Specific protein 1) 結合位及 SF-1 (Steroidogenic factor 1) 結合位等，控制了 *CYP11A1* 啟動子在各類固醇生成組織中的基本轉錄活性 (Shih et al., 2011)。遠端於約-1.9 kb 處有兩個 adrenal-specific enhancer (AdE1, AdE2)，參與了腎上腺、性腺、胎盤等類固醇荷爾蒙生成細胞株之 *CYP11A1* 調控 (Chou et al., 1996; Guo et al., 1994)。在-1.6 kb 至-1.5 kb 左右處則有兩個 AP-1 (activating protein 1) 結合序列及另一個 SF-1 結合處 (Guo et al., 2007; Hum et al., 1993)。在腎上腺及性腺中 SF-1 是活化 *CYP11A1* 基因轉錄的關鍵條件因子 (Clemens et al., 1994; Lala et al., 1992)，可提高 *CYP11A1* 啟動子的轉錄活性。近端的 SF-1 結合位為成鼠腎上腺中 *CYP11A1* 的表現所必須 (Hu et al., 2001)；遠端的 SF-1 結合位對胚胎鼠發育中的腎上腺之 *CYP11A1* 表現則扮演重要的角色 (Chiang et al., 2011)。

然而 *CYP11A1* 在胎盤中似乎不受 SF-1 調控，而是受啟動子-155 至-131 bp 序列間 TReP-132/LBP-1b、LBP-9 (long terminal binding protein) 結合位、-475 至-447bp 內 CRE (cAMP responsive element) 以及-490 bp 附近之 GATA 序列影響 (Gizard et al., 2001; Huang and Miller, 2000; Sher et al., 2007)。這樣的結果也說明 *CYP11A1* 啟動子的調控機制是具有組織專一性的。

3. *CYP11A1* 啟動子於腦部的調控

由於 *CYP11A1* 於腦部表現程度過低不易偵測的緣故，對於 *CYP11A1* 啟動子在腦部調控的研究並不多。在細胞實驗中發現，大鼠神經膠瘤細胞株 C6 glioma

cell 中可以觀察到 *CYP11A1* 啟動子轉錄活性，但其調控與 SF-1 似乎沒有關聯 (Mellon and Deschepper, 1993; Zhang et al., 1995)。而在基因轉殖小鼠中觀察到長度 2.3 kb 以及 4.4 kb 的 *CYP11A1* 啟動子都可以驅動報導基因 LacZ 在腎上腺與性腺表現，但在腦中卻沒有偵測到其轉錄活性 (Hu et al., 1999)。

本實驗室以 Cre 重組酶取代 LacZ 作為報導基因建立 SCC-Cre 轉殖小鼠，並配合帶有 LacZ 報導基因的 ROSA26R 小鼠 (Soriano, 1999) 產生 SCC-Cre/R26R 小鼠，利用 Cre-loxP 系統分析 *CYP11A1* 啟動子的神經轉錄活性，結果發現長度 4.4 kb 的啟動子可以令 Cre 重組酶於許多腦區表現，包括端腦、中腦、間腦、海馬迴、視網膜以及嗅覺上皮細胞等 (Chiang et al., 2011; Wu et al., 2007)，說明 4.4 kb 長度之 *CYP11A1* 啟動子在這些區域具有足夠轉錄活性驅動報導基因表現。然而將啟動子內兩個 SF-1 的結合位各自進行突變產生基因轉殖鼠的結果發現，SF-1 結合位並不會影響 *CYP11A1* 啟動子於腦部驅動 Cre 重組酶表現之活性 (Chiang et al., 2011)，也說明 *CYP11A1* 啟動子的腦部轉錄活性調控可能與腎上腺、性腺不同。

四、 Cre-loxP 系統

Cre 重組酶 (Cre recombinase) 是於 bacteriophage P1 找到，屬於整合酶 (integrase) 家族中的特定位置整合酶 (site-specific recombinase)，分子大小約為 38 kD，可以辨認 bacteriophage P1 上的 loxP 位置。若一段 DNA 片段被兩個同向的 loxP 包夾時，Cre 重組酶便會辨識 loxP 的位置，進行 DNA 重組而剔除 loxP 中間所夾的 DNA 片段 (Nagy, 2000)，此特性目前被廣泛應用於條件式基因剔除 (conditional knockout)，給予研究者能夠自行選擇在特定器官或是時間點上將目標基因剔除。欲以 Cre-loxP 系統達到基因剔除，需建立兩種基因轉殖小鼠：(1) 特定啟動子驅動 Cre 重組酶，(2) 將 loxP 嵌入目標基因。經 Cre 轉殖小鼠與帶有 loxP 小鼠的交配，產生之後代體內同時具有 Cre 與 loxP 基因，則 Cre 重組酶表

現之處會將 loxP 包圍之片段剔除，達成有條件的基因剔除。Cre 重組酶的表現決定目標基因剔除的組織與時間專一性。

1999 年 Soriano 成功建立以長駐基因 (housekeeping gene) 啟動子 ROSA 驅動報導基因 LacZ 之基因轉殖鼠 ROSA26R，並於啟動子與報導基因之間嵌入一段具有 loxP 包夾的 neomycin 篩選基因 (Soriano, 1999)。經由交配或是暫時性基因轉殖令 ROSA26R 小鼠獲得外來帶有特定啟動子驅動 Cre 重組酶之質體後，便可利用 β -galactosidase 染色偵測 Cre 重組酶於組織內的表現，進一步推測特定啟動子的驅動能力。

五、研究目的

CYP11A1 基因經由 RT-PCR 以及免疫染色等方法，已被證實會在腦部表現 (Compagnone et al., 1995; Kimoto et al., 2001; Kohchi et al., 1998; Sanne and Krueger, 1995)。但因 mRNA 表現量太低不易偵測 (Chiang et al., 2010; Mellon and Deschepper, 1993; Sanne and Krueger, 1995)，目前對於 *CYP11A1* 啟動子於腦部的調控機制仍不清楚。本實驗室利用基因轉殖小鼠模式，說明 4.4 kb *CYP11A1* 啟動子許多腦區都具有轉錄活性 (Wu et al., 2007)；而使用不同長度之 *CYP11A1* 啟動子產生轉殖基因小鼠的結果發現，3.8 kb 與 3.5 kb 長度之啟動子保留了與 4.4kb 相同的轉錄活性，但是 3.2kb 及 2.7 kb 長度之啟動子卻喪失了間腦、嗅覺上皮細胞、中腦前端等腦區的轉錄活性，只剩中腦尾端仍可驅動 Cre 重組酶表現 (Chiang et al., 2011)。這樣的結果顯示 3.2 kb 啟動子所欠缺的 300 bp 序列可能與表現 Cre 重組酶區域之 *CYP11A1* 啟動子活化有關。我們合理假設這段序列具有轉錄因子或是調控分子結合位，調控這些腦區的 *CYP11A1* 啟動子活性。因此，我們希望利用體外 (in vitro) 系統尋找這 300 bp 序列中重要的分子結合位。

另一方面，由於利用基因轉殖小鼠進行啟動子研究會耗費許多時間、金錢與人力，我們想建立一套體外基因轉入系統增進研究效率。視網膜電穿孔轉染法為

許多實驗室所採用之體外基因轉入方式 (Kay et al., 2012; Zhang et al., 2012)，而本實驗室也於小鼠視網膜上觀察到*CYP11A1*啟動子的轉錄活性 (羅文均，2009；李芮甄，2010)，所以我們希望能建立此基因轉入模式，作為另一種探討*CYP11A1*啟動子的神經調控之方法。綜合以上敘述，提出本論文的目的如下：

1. 利用凝膠遷移法 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 尋找 *CYP11A1* 啟動子於神經系統之調控序列。
2. 建立視網膜組織電穿孔轉染法之體外基因轉入模式。



第二章 材料與方法

一、凝膠遷移 (Electrophoresis mobility shift assay, EMSA)

1. 組織核蛋白萃取 (Nuclear proteins extraction)

配製組織萃取緩衝液

Buffer A: 10 mM HEPES (pH7.9)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.5% NP40。

使用前加入 0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、1 µg/µL leupeptin、2 µg/µL aprotinin。

Buffer B: 20 mM HEPES (pH7.9)、25% glycerol、0.42 M NaCl、0.2 mM EDTA、1.5 mM MgCl₂。使用前加入 0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、1 µg/µL leupeptin、2 µg/µL aprotinin。

出生後八至十天之 ROSA26R 幼鼠取嗅覺上皮組織，約 100 mg (需 6~8 隻)，放入置於冰上的 1.5 mL tube 中，此後過程全程於冰上進行。用小剪剪碎組織後加入 500 µL buffer A，以電動研磨器將組織磨碎。將組織液以 Dounce homogenizer (loose) 進一步研磨。以管中 solution 沖洗管壁上剩餘組織後再將組織液移至新的 1.5 mL tube，冰上作用 15 分鐘。以 4°C，14000 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液即為細胞質蛋白萃取液。再以 500 µL buffer A 清洗下層沉澱物，以 4°C，14000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，重複二到三次以求盡量除去細胞質蛋白。加入 500 µL buffer B，vortex 打散沉澱物後以 Polytron 高速均質乳化機均質化 (每次五秒進行約八到十次，每次間隔五秒) 後置於冰上作用 30 分鐘。接著以 4°C，14000 rpm 離心 30 分鐘後取出上清液即為細胞核蛋白萃取液，分裝保存於 -80°C。

2. 寡核苷酸探針設計

使用之寡核苷酸探針序列為：

Probe	Location	Sequence (5'-3')
1	-3500/-3442	CAATTCACAG AGCAAGAGTG GGCTTGAGCA AGTGGCTCAG GAGCCCCTTC AATTAGAGA
2	-3447/-3391	TAGAGATTTT ATTAAGCTAA AGAACATGAA CACCCCCGGT GCCCTCCAGA GGCCTCC
3	-3400/-3346	AGAGGCCTCC AATCAGTTAC ATCCAATGAA GGATTGATCC GTGACCAATT AGAGG
4	-3355/-3298	CAATTAGAGG CTTAAGTGGC GACTTGGCCT GTGGTTATCA CAGAAGTGAA GATGTGGC
5	-3305/-3247	GATGTGGCCT GTATGTTGCC TAATCCTGCC TAGAATTGGC TGTACCTGCT GTGCCTTTT
6	-3254/-3201	TGCCTTTTGC TTATGTGAAC TGGCTGCACC TGCTCTTCTT TTGTTCCCTAC CTTA
3-1	-3400/-3376	AGAGGCCTCC AATCAGTTAC ATCCA
3-2	-3385/-3356	GTTACATCCA ATGAAGGATT GATCCGTGAC
3-3	-3375/-3346	ATGAAGGATT GATCCGTGAC CAATTAGAGG
3-2m1	-3385/-3356	agggaATCCA ATGAAGGATT GATCCGTGAC
3-2m2	-3385/-3356	GTTACggggg ATGAAGGATT GATCCGTGAC
3-3m1	-3375/-3346	ATGAAGGATT GATCCGTGAC gggggAGAGG
3-3m2	-3375/-3346	ATGAAGGATT GATCCGTGAC CAATTttttt
3-3m3	-3375/-3346	ATGAAGGATT GATCCaaaga CAATTAGAGG
5-1	-3305/-3286	GATGTGGCCT GTATGTTGCC
5-2	-3295/-3266	GTATGTTGCC TAATCCTGCC TAGAATTGGC
5-3	-3275/-3245	TAGAATTGGC TGTACCTGCT GTGCCTTTTG C
5-3m1	-3275/-3245	TAGAATTGGC aaagaCTGCT GTGCCTTTTG C

5-3m2	-3275/-3245	TAGAAaaaaa	TGTACCTGCT	GTGCCTTTTG	C
5-3m3	-3275/-3245	ccccTTGGC	TGTACCTGCT	GTGCCTTTTG	C

3. 寡核苷酸探針製備

以 ^{32}P -ATP 標定轉錄股 (sense)：5 pmole 轉錄股寡核苷酸、2.5 μL ^{32}P -ATP、1 unit T4 polynucleotide kinase (NEB)、1 μL 10x buffer，總體積 10 μL ，於 37°C 下作用一小時。

將標定好的轉錄股序列加入 10 pmole 相對應之反轉錄股寡核苷酸、1 μL 20x annealing buffer (200 mM Tris-HCl pH7.9、40 mM MgCl_2 、1 M NaCl、20 mM EDTA)、總體積 20 μL 。95°C 加熱五分鐘後關閉加熱器，使兩股於溫度下降至室溫過程中慢慢黏合，至少作用一小時。另以相同方法製備無放射性標定之雙股寡核苷酸做為探針競爭者。黏合完畢之放射性標定寡核苷酸探針接著加入 ddH₂O 至總體積 50 μL ，利用 illustra MicroSpin G-25 Columns (GE) 純化後於 4°C 保存。使用前將體積稀釋八倍，可利用放射性測量儀 (Beckman LS 6500) 測量活性，須達到 $10^4\sim 10^5$ cpm/ μL 方可使用。

4. 放射性寡核苷酸探針與蛋白結合反應

取 2 μL (0.025 pmole) 放射性標定之雙股寡核苷酸探針，加入 3 μL 7x gel shift reaction buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.5、1 mM EDTA、50 mM KCl，使用前加入 1 mM DTT)、1 μL BSA (2 mg/mL)、1 μL dI-dC (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，Sigma P4929)、15 μg 核蛋白萃取物，總體積 20 μL ，置於室溫下作用 15 分鐘。進行電泳前，加入 2 μL 10x loading dye (glycerol 700 μL 、bromophenol blue 3.5 mg、ddH₂O 700 μL)

5. 聚丙烯醯胺膠體電泳

本實驗使用 1.5 mm 十七孔齒梳之 6% 聚丙烯醯胺膠體，配製如下：

Stock solution	6% (30 mL)
Acrylamide/Bis-acrylamide (37.5 : 1) 40% solution	4.52 mL
5x TBE buffer	3 mL
10% ammonium persulfate	200 uL
TEMED	40 uL
ddH ₂ O	22.24 mL
Total	30 mL

註：5x TBE buffer (500 mL)：Tris base 27 g、Boric acid 13.75 g、
EDTA 2.325 g。

配製完成之膠體置於室溫下凝固完全後，將其置於電泳槽中，注入 0.5x TBE 作為電泳緩衝液。先以 150 V 預跑一小時，然後依序將樣本加入膠體孔槽中，以 100 V 進行電泳；dye 的位置離底部三公分時停止電泳。利用適當大小之圖畫紙將膠片黏起，上方覆蓋保鮮膜後置於 gel dryer (Buo-Rad model 583) 上烘乾膠片 (80°C 一小時)。烘乾後的膠片置於 autoradiogram cassette 內用磷光板隔夜顯影，隔天將顯影後之磷光板用 scanner (GE typhoon 9400) 掃描成像並分析。

二、西方墨點法

以蛋白質之聚丙烯醯胺膠體 SDS-PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳，膠體結構分為兩層，上層為含 4% acrylamide 之 stacking gel，下層為含 10% acrylamide 之 separating gel。配置完成之膠體靜置於室溫下使其完全凝固後，放置於電泳槽，注入電泳緩衝液 (0.25 M Tris、1.92 M Glycine、0.03 M EDTA 及 1% SDS)，將蛋白質樣本依序加入膠體孔槽中。先通以 80 伏特之電壓進行電泳 20 分鐘，再以 120 伏特之電壓進行電泳約 1~2 小時。用於西方墨點法之初級抗體如下：

Goat anti-OMP (Q12, Santa Cruz)，1：1000 稀釋

Mouse anti-GAPDH (6C5, Millipore) , 1 : 10000 稀釋

Mouse anti-Histone H2B (5HH2-2A8, Millipore) , 1 : 10000 稀釋

次級抗體如下：

HRP-conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz , sc-2020) , 1:5000 稀釋

Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Millipore , AP124P) , 1:5000 稀釋

三、質體

1. 以人類 *CYP11A1* 啟動子驅動 Cre 重組酶基因表現之質體

1). phSCC4.4-iCreIn

由 4.4 kb 之人類 *CYP11A1* 啟動子驅動產生 Cre 重組酶之質體(Chiang et al., 2010)。

2). phSCC3.5-iCreIn

由 3.5 kb 之人類 *CYP11A1* 啟動子驅動產生 Cre 重組酶之質體，由林有啟所建立。

3). phSCC3.2-iCreIn

由 3.2 kb 之人類 *CYP11A1* 啟動子驅動產生 Cre 重組酶之質體，由林有啟所建立。

4). phSCC1.7-iCreIn

由 phSCC4.4k-iCreIn 先以 *SphI* 切開後，再以 *SpeI* 行部分切割，以膠體回收方式獲得大小約 8.9 kb 之片段，以 Klenow 反應處理令兩個限制酶切口都形成鈍端後再行自接反應得到 phSCC1.7-iCreIn 之質體。

2. pEGFP-N1

以巨細胞病毒早期基因啟動子 (CMV promoter) 驅動產生 EGFP 螢光訊號之質體(Clonetech)。

3. phSCC4.4-EGFP

建構以 4.4 kb 之人類 *CYP11A1* 啟動子驅動螢光蛋白基因表現之質體。

phSCC4.4-LacZ 以 *Bam*HI 切下 4.4 kb 之人類 *CYP11A1* 啟動子，接入 pEGFP-N1 之 *Bam*HI 切位取代原本之巨細胞病毒早期基因啟動子 (CMV promoter) 得到 phSCC4.4-EGFP 質體。

4. pCMV β

以巨細胞病毒早期基因啟動子 (CMV promoter) 驅動產生 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 之質體(Clonetech)。

5. pCMV-iCre

以巨細胞病毒早期基因啟動子 (CMV promoter) 驅動產生 Cre 重組酶 (Cre recombinase) 之質體，由吳姿萱所建立。

6. iCre-polyA

不具有啟動子驅動 Cre 重組酶之質體，由胡孟君博士建立。

四、視網膜組織原代培養

本實驗室建立之視網膜原代培養技術以及視網膜電穿孔轉染法由國立台灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所王致恬老師所指導。

1. Retinal dissection solution 配製 (1 L)

藥品	終濃度	加入量	藥品
HBSS	1x	100 mL	10x stock (GIBCO, 14065-056) 保存於 4°C
HEPES	10 mM	2.38 g	SIGMA (H3784)
NaHCO ₃	0.35 g/L	0.35 g	

上述藥品加入適量 ddH₂O 攪拌均勻至粉末全溶 (約需 30~60 分鐘), 調整 pH 值至 7.35, 再補 ddH₂O 至 1 L。以 0.20 μm filter 過濾至乾淨血清瓶 (經 sonication 處理) 中並保持無菌, 保存於 4°C。

2. Retinal serum free culture media-A (SFCM-A) 配製 (50 mL)

藥品	終濃度	加入量	藥品
D-Glucose	0.6%	0.3 g	
Neurobasal A medium		47 mL	GIBCO (10888-022), 保存於 4°C
L-glutamine	2 mM	500 μL	200 mM stock (GIBCO, 25030-081), 保存於 -20°C
B27	1x	1 mL	50x stock (GIBCO, 17504-044), 保存於 -20°C
HEPES	10 mM	500 μL	配製 1 M stock (SIGMA, H3784), 調整 pH 值為 7.35~7.4, 並保存於 4°C
Sodium pyruvate	1 mM	500 μL	100 mM stock (GIBCO, 11360-070), 保存於 4°C
Insulin solution	2.5 μg/mL	250 μL	配製 200x stock (5 mg Insulin (SIGMA, I-5500)、3 μL 1N HCl、0.01 g BSA、補 ddH ₂ O 至總體積 10 mL), 保存於 4°C
Mixture of penicillin and streptomycin	1x	500 μL	100x stock (GIBCO, 15140-122), 保存於 -20°C

以上藥品於細胞培養用抽氣櫃中混合均勻後 (總體積 50 mL), 使用 0.20 μm

filter (Sartorius Stedim biotech, Minstart) 過濾至全新乾淨 50 mL 塑膠離心管，於外部包上鋁箔紙避光置於 4°C 保存，可保存約一個月。要使用於視網膜組織原代培養前一天，取出 20 mL SFCM-A 加入 1.2 μ L 100 mM forskolin (SIGMA, F6886)，分裝於 1.5 mL tube 中，避光保存於 -20°C。SFCM-A/forskolin 培養液只能保存一周。

3. 視網膜組織顯微手術

將出生後第二日之 ROSA26R 幼鼠放入碎冰塊中使其昏迷，以中剪將其頭部剪斷，用刀片 (Feather NO.10) 劃開眼皮，以微彎小剪小心挖出完整眼球，放入盛有 retinal dissection solution 之培養皿中。在解剖顯微鏡 (Leica EZ4D) 下用 5 號鑷 (WPI 14095) 小心去除多餘組織，用刀片 (Feather NO.11) 於角膜稍後側邊緣淺戳出一個小洞，注意不可戳太深破壞到視網膜。用虹彩剪 (WPI 500086) 從小洞伸入剪一圈，用 5 號鑷小心去除角膜以及水晶體，再仔細剝除黑色之鞏膜與脈絡膜以及視神經，過程中盡量避免碰觸到內側之視網膜，便可得到完整之視網膜組織。

4. 視網膜組織原代培養

將取得之完整視網膜組織以玻璃探針將周圍稍微壓平，隨後以神經節細胞層 (ganglia cell layer) 朝下的方向盡量攤平於載玻片上並擠出氣泡，再以經 UV 照射殺菌過、剪成適當大小的濾紙 (Millipore, HABP02500) 蓋住視網膜使其貼附於濾紙上。待濾紙完全浸濕、視網膜完全服貼於濾紙上之後，於細胞培養用抽氣櫃中將濾紙以組織面朝上的方式置於已加入 SFCM-A/forskolin 培養液之 24 孔盤 (每孔約 350 μ L) 內培養。培養箱的條件為 5% CO₂，35°C。隔天必須盡早更換 SFCM-A/forskolin 培養液，之後則每 24 小時更換一次；更換時先於未使用過之新孔內加好 SFCM-A/forskolin 培養液，再將組織連同濾紙一同移入其中。若視

網膜有飄浮的現象，則需在解剖顯微鏡下用新的濾紙重新進行貼附的動作再繼續培養。

五、視網膜電穿孔轉染法

將已經貼附於濾紙上之視網膜組織於 24 孔盤中先浸於欲轉染之 250 μL DNA 溶液中 (以 retinal dissection solution 稀釋，終濃度為 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 於室溫下作用 10 分鐘以增加轉染效率。架設好以白金箔 (Aldrich, 349364) 自製之電穿孔用電極，以下方板狀電極連接正極，上方筆狀電極連接負極的方式經 BNC 轉接頭連接到電穿孔轉殖器 (BTX ECM 830)。將貼附視網膜組織之濾紙自孔盤中取出，組織面朝上放在板狀電極之白金箔區，接著將 250 μL DNA 溶液覆蓋組織，避免氣泡產生影響轉染效率。以定位儀調整至上下電極距離 4 mm，電穿孔條件為電壓 (voltage) 28 V，脈衝長 (pulse length) 50 msec，脈衝數 (pulse number) 2，脈衝間隔 (pulse interval) 1 sec。電穿孔轉染完之視網膜組織放回 24 孔盤內，置於細胞培養箱中培養。

六、小鼠視網膜組織 X-gal 酵素活性染色

轉染後視網膜組織培養四至五天後，去除培養液，加入固定液 (2% paraformaldehyde、0.2% glutaldehyde、1x PBS)，於室溫固定三十分鐘至一小時。接著以 1x PBS 清洗三次，每次五分鐘。換置 X-gal 染色液 (1 mg/mL X-gal、5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、2 mM MgCl_2 、0.02% NP40、0.15 mg/mL chloroquine、1x PBS)，室溫下避光反應 12~16 小時。用 1x PBS 清洗後，置於 4% paraformaldehyde/PBS 保存。以水彩筆、彎鑷與玻璃探針於解剖顯微鏡下將視網膜小心由濾紙上取下，再以神經節細胞層朝上的方式將視網膜置於載玻片上，以封片膠滴於視網膜上，蓋下蓋玻片封片並避免氣泡產生，在光學顯微鏡

(Zeiss Axioskop 40 microscope) 或螢光顯微鏡下觀察並拍照記錄。



第三章 結果

一、嗅覺上皮細胞內具有可與 *CYP11A1* 啟動子序列結合之分子

1. 嗅覺上皮組織細胞核蛋白質萃取

為了進行 EMSA 反應，我從出生第八天的小鼠取得嗅覺上皮組織萃取細胞核蛋白質，並以西方墨點法分析萃取液。圖一 A 結果顯示，細胞質蛋白質 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 可以在全細胞萃取液與細胞質萃取液中偵測到，但也有少量存在於細胞核萃取液中；而細胞核蛋白質 Histone H2B 則幾乎存在於細胞核萃取液中。此結果說明，萃取組織時，細胞膜破除可能不完全，但可成功分離出細胞核蛋白質。此外，為確認此為嗅覺上皮細胞萃取液，以專一表現於嗅感覺神經元 (olfactory sensory neuron) 的分子 OMP (olfactory marker protein) 進行分析，結果可以偵測到 OMP 存在於嗅覺上皮組織的細胞質萃取液，而 HEK293T 細胞株以及腎上腺組織萃取液則無法測得 (圖一 B)。後續實驗之核蛋白質皆以此方法萃取。

2. *CYP11A1* 啟動子序列-3.5 kb 與-3.2 kb 間有潛在調控因子

為了找尋 *CYP11A1* 啟動子-3.5 kb 與-3.2 kb 片段間的重要調控序列，我們將此 300 bp 序列分為六段合成寡核苷酸，如圖二 A 所示，依序編號為 1 至 6。合成之寡核苷酸經放射性標定做為探針，與嗅覺上皮細胞核蛋白質作用，進行 EMSA 分析。圖二 B 結果顯示，與細胞核萃取液反應後，1 號、4 號與 6 號探針沒有觀察到明顯的變化 (第 2、14、22 行)，而 2 號、3 號以及 5 號探針則有向上遷移的條帶出現，說明可能有蛋白質與此三段探針結合，因此後續實驗即針對這三段序列進行分析。

3. -3447 至-3391 序列 (2 號探針) 之 EMSA 分析

2 號探針與嗅覺上皮細胞核蛋白質的反應中，我們觀察到有明顯的條帶遷移現象 (圖三第 2 行)。為了確認此現象是否為分子與序列間專一性的結合所造成，給予過量 (100 倍) 非放射性標定之相同或不同寡核苷酸，若相同的寡核苷酸可以令條帶減弱消失，而加入不同之寡核苷酸不會使條帶消失，則此條帶便可能是專一性的結合現象所造成。圖三結果顯示，過量非放射性標定之相同寡核苷酸 (2 號) 會減弱條帶強度 (圖三第 3 行)，給予不同寡核苷酸 (4 號) 則會使此條帶幾乎被競爭掉 (圖三第 4 行)，顯示 2 號探針序列與分子的結合並不具有專一性。因 *CYP11A1* 啟動子的轉錄活性也呈現在腦的其他區域如海馬迴與中腦，因此我們更進一步萃取其細胞核蛋白質進行相同的實驗，並得到相似的結果 (圖三第 5~12 行)。以上結果說明了這些組織中的分子與 2 號探針序列的結合並不具有專一性。

4. -3400 至-3346 序列 (3 號探針) 之 EMSA 分析

1) 3 號探針之 EMSA 反應

在 3 號探針與嗅覺上皮細胞核蛋白質的反應可以觀察到三條遷移條帶 (圖四 A 第 2 行)，命名為 3a、3b 與 3c。在加入過量之相同序列非放射性標定寡核苷酸 (3 號) 的競爭下便消失 (圖四 A 第 3 行)，而使用不同序列之寡核苷酸 (1 號) 進行競爭反應時，3a 與 3b 條帶減弱，而 3c 條帶減弱更為明顯 (第 4 行)。若與中腦核蛋白質反應時，可以觀察到與嗅覺上皮細胞類似的結果，但是中腦之 3b 條帶訊號較強 (圖四 A 第 9~12 行)；但與海馬迴核蛋白質反應時，只能觀察到較明顯之條帶 3a、較弱之條帶 3c，而沒有觀察到條帶 3b (圖四 A 第 5~8 行)。這樣的

結果可能說明造成條帶 3a 的分子存在於三種組織中，形成 3c 之分子於海馬迴中存在量可能較少，產生條帶 3b 的分子則可能不存在於海馬迴中。但當我將三種組織之細胞核蛋白質萃取液，經膠體電泳以卡馬西藍染料 (Coomassie Brilliant Blue) 分析，結果發現海馬迴的訊號較弱 (圖四 B)，因此也不能排除是因萃取之海馬迴核蛋白質質量較少而令 3b 與 3c 訊號減弱甚至消失。

2) 序列分段之 EMSA 分析

為了確認各條帶在 3 號探針序列中的結合位置，3 號探針如圖五 A 所示分成 3-1、3-2 及 3-3 三段寡核苷酸，經放射性標定後與嗅覺上皮細胞核蛋白進行 EMSA 分析，並以相似長度之寡核苷酸 CP (位於 *CYP11A1* 啟動子-121~-92 之序列，含有 SF-1 結合位) 做為非專一性競爭者。由圖五 B 結果可知探針 3-1 會出現條帶 3a' (第 2 行)，探針 3-2 可以觀察到條帶 3a'、3c' (第 6 行)，探針 3-3 則有條帶 3b' 出現 (第 10 行)。加入過量相同之寡核苷酸會造成 3a'、3b' 與 3c' 消失 (第 3、7、11 行)，而在 CP 寡核苷酸競爭下 3a' 與 3b' 保留不變 (第 4、8、12 行)，3c' 則明顯減弱，顯示 3a' 與 3b' 的分子結合具有專一性。條帶 3a' 同時存在於探針 3-1 與 3-2，因此推測造成 3a' 的結合位可能為兩個探針重疊的序列。3b' 只存在於探針 3-3，此分子結合位可能在探針 3-3 不與 3-2 重疊的序列。我們進一步將每一段探針分別使用 3-1、3-2、3-3 進行競爭反應，結果發現探針 3-1 產生的 3a' 在 3-1、3-2 競爭反應下都會消失 (第 15、16 行)，但加入 3-3 則不會完全消失 (第 17 行)；探針 3-2 產生的 3a' 亦有相同的結果 (第 20~22 行)。而條帶 3b' 於使用 3-3 競爭時消失 (第 25 行)，但仍可在 3-1、3-2 做為競爭者時觀察到 (第 26、27 行)。此結果符合我們對於 3a'、3b' 結合位序列位置之推論。

3) 序列定點突變之 EMSA 分析

為了探討分子結合可能的序列，如圖六 A 所示我們將探針 3-2 上與 3-1 重疊的部分進行定點突變產生 3-2m1 以及 3-2m2 兩段寡核苷酸，同時也將探針 3-3

的序列進行定點突變製備 3-3m1、3-3m2 (與 3-2 序列無重疊) 以及 3-3m3 (與 3-2 序列有重疊) 三段寡核苷酸。圖六 B 為其與嗅覺上皮細胞之 EMSA 反應，可以發現 3a' 在探針 3-1 中強度較 3-2 弱 (第 2、7 行)，不過兩者以 3-2m1 做為競爭者時都大量地減少，3-2m2 減弱程度也都相對較少 (第 4、5、9、10 行)，顯示 3-2m2 突變的序列 AGAGG 對於條帶 3a' 形成是很重要的。此外，條帶 3c' 在 3-2m1 的競爭下強度減弱，加入 3-2m2 時則完全消失，故推論造成條帶 3c' 的結合位可能位於 3-2m1 被突變的序列 CAATT。

至於探針 3-3 上的條帶 3b'，仍會被 3-3m1、3-3m2 競爭而消失 (第 14、15 行)，因此再產生新的突變 3-3m3。結果顯示，3-3m3 無法有效地與 3-3wt 競爭 (第 16 行)，顯示 3-3m3 所突變之序列 GTGAC 上可能含有造成條帶 3b' 的結合位。

5. -3305 至-3247 序列 (5 號探針) 之 EMSA 分析

1) 5 號探針之 EMSA 反應

圖七結果可以發現 5 號探針與嗅覺上皮細胞核萃取液反應時有條帶產生 (第 2 行)，但其強度不如 3 號探針。這些條帶在相同寡核苷酸的競爭下便完全消失 (第 3 行)，但在 1 號寡核苷酸的反應下仍可觀察到微弱的訊號 (第 4 行)。而以海馬迴或中腦的細胞核萃取液進行 EMSA 反應時，則產生更多的訊號 (第 6、10 行)，但加入 5 號或 1 號寡核苷酸後訊號便消失 (第 3、4、7、8、11、12 行)。

2) 序列分段之 EMSA 分析

我們同樣將 5 號探針依圖八 A 所示分為 5-1、5-2、5-3 三段寡核苷酸，經放射性標定與嗅覺上皮細胞核萃取液進行 EMSA 反應。由圖八 B 結果發現，在探針 5-3 中有明顯遷移的兩條條帶 5a、5b (第 12 行)，而於探針 5-2 中也有微弱的相同位置之微弱條帶 (第 7 行)。以 5-3 做競爭時條帶便消失 (第 13 行)，加入 5-2

競爭令條帶強度減弱 (第 15 行), 5-1 則無法競爭 (第 14 行)。改以海馬迴細胞核萃取液反應時也可以觀察到相同結果 (第 26~30 行)。因此我們判斷造成條帶的分子結合位置可能位於 5-2 與 5-3 重疊之序列中。

3) 序列定點突變之 EMSA 分析 5-3 經過不同序列的定點突變, 合成 5-3m1、5-3m2、5-3m3 三段寡核苷酸, 如圖九 A 所示, 5-3m1 所突變之序列 TGTAC 不與 5-2 重疊, 5-3m2 突變之 TTGGC 及 5-3m3 之 TAGAA 則有。圖九 B 結果顯示, 與嗅覺上皮細胞核蛋白萃取液反應時, 5-3m3 可以有效與探針競爭造成 5a、5b 條帶都消失 (第 6 行); 5-3m2 則無法競爭 5b 條帶 (第 5 行); 加入 5-3m1 時結果與 5-3m2 類似, 但訊號變得較弱 (第 4 行)。利用海馬迴核蛋白萃取液進行實驗時也有相同的結果, 只是加入 5-3m2 後的訊號較嗅覺上皮細胞微弱。

二、建立視網膜電穿孔轉染法進行體外基因轉入

1. 視網膜電穿孔轉染法可成功轉入外來基因

在臺灣大學分子與細胞生物學研究所王致恬老師的指導下, 我們組裝了進行視網膜電穿孔轉染之自製電極。為了確認視網膜電穿孔轉染法之可行性, 我們利用在許多組織都可以表現強轉錄活性之巨細胞病毒早期基因啟動子 (CMV promoter, Cytomegalovirus) 驅動綠色螢光蛋白質 (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) 或 β -galactosidase 兩種不同的報導基因來進行測試。將兩種質體分別轉入出生兩天大之幼鼠視網膜組織, 進行原代培養並觀察。結果如圖十所示, 我們在螢光顯微鏡下清楚觀察到綠色螢光蛋白質的表現 (A、B), 而在光學顯微鏡下也的確觀察到呈現藍色 LacZ 訊號之細胞 (C、D), 證明電穿孔可將外來質體轉染至原代培養之視網膜組織。每一個質體的實驗都重複二至四次, 每次實驗至少有兩個樣本數, 實驗結果記錄於表一。

而為了測試 Cre-loxP 系統是否可應用於此視網膜電穿孔轉染法, 我們取

ROSA26R 幼鼠視網膜進行實驗。將 CMV 啟動子接上 Cre 重組酶的質體 pCMV-iCre 轉染入視網膜，結果如圖十 E、F，我們的確觀察到了 Cre 重組酶的表現，表示 Cre-loxP 系統可以使用於視網膜電穿孔轉染法上研究啟動子之轉錄活性。

2. *CYP11A1* 啟動子轉入視網膜組織之表現

為了測試轉入之 *CYP11A1* 啟動子於視網膜是否具有轉錄活性，我們以不同長度啟動子接 Cre 重組酶之質體，利用視網膜電穿孔轉染法轉入幼鼠 ROSA26R 視網膜中，以 LacZ 的呈色判斷 Cre 重組酶表現程度。圖十一顯示，4.4 kb (A、B)、3.5 kb (C、D)、3.2 kb (E、F) 三種長度之 *CYP11A1* 啟動子接 Cre 重組酶質體進行轉染後，都只有零星的 LacZ 呈色 (黑色箭號)，其表現量遠少於圖十 E、F 中使用 CMV 啟動子的結果。若以不具任何啟動子的載體 piCre-polyA 作為對照組進行實驗，也有類似的訊號 (G、H)。然而在未使用任何質體，只單純進行轉染實驗的對照組中無法觀察到任何 LacZ 呈色 (表一)。由以上實驗結果，我們判斷 LacZ 的訊號可能是質體內 Cre 報導基因本身呈現的背景表現量，並非受到 *CYP11A1* 啟動子的驅動而表現。

第四章 討論

本實驗室利用暫時性基因轉殖鼠模式分析 *CYP11A1* 啟動子在腦部的轉錄活性，結果發現-3.5 kb 至-3.2 kb 間存在重要的調控因子，影響啟動子在大部分腦區的轉錄活性 (Wu et al., 2007)。本篇論文欲利用 EMSA 反應以及視網膜電穿孔法兩種方式，找出 *CYP11A1* 啟動子在此 300 bp 片段內之重要調控序列。

EMSA 反應可以偵測蛋白質分子與 DNA 序列間的結合。我們將 300 bp 之序列分成六段，合成探針後利用 EMSA 反應與嗅覺上皮細胞核蛋白質作用進行篩選。結果顯示，在 2 號、3 號、5 號探針中可能有分子的結合，但是 2 號探針的分子結合似乎不具有專一性；而針對 3 號以及 5 號的分析，我們找出了影響分子結合的重要序列。

一、*CYP11A1* 啟動子-3400 與-3346 (3 號探針) 間序列之分析結果

1. EMSA 結果

在 3 號探針 (-3400 至-3346) 之 EMSA 結果我們觀察到三條條帶的遷移，且使用不同神經組織之核蛋白質得到的結果不盡相同。中腦與嗅覺上皮細胞有著相似的三條條帶，但海馬迴的反應結果只有一條 (圖四 A)。在前人實驗中，使用 2.7 kb 長度之啟動子時，中腦尾端部分便可表現出 Cre 重組酶，但中腦其他部分以至於間腦、嗅覺上皮細胞等處則需要 3.5 kb 長度之啟動子才能表現 (Wu et al., 2007)，顯示中腦尾端之調控可能異於其他腦區，並說明 *CYP11A1* 啟動子在不同的神經組織中可能有相異的調控機制。EMSA 的結果也暗示海馬迴的 *CYP11A1* 啟動子調控機制可能與嗅覺上皮組織、中腦有所不同。

將 3 號序列分段進行 EMSA 結果顯示，我們同樣可以觀察到三段不同的條帶，圖五中分子量較高而位於較上方的兩條條帶 (3a'、3b') 與圖四觀察到的條帶 (3a、3b) 類似，但是最下方的條帶 (3c') 比起圖四所觀察到的下方條帶 (3c) 分子量似乎較小，因此無法確定是否由相同分子結合所造成。經由分段與序列突變的結果，我們推測 3 號探針上至少有三種不同分子的結合，影響結合的重要序列標示於圖十二 A。ATCCA 位於 3-1 與 3-2 上，影響條帶 3a' 的結合。GTTAC 也位於 3-1 與 3-2 上，影響條帶 3c' 的結合，但條帶 3c' 卻只能在 3-2 探針的結果觀察到，我們推測造成 3c' 條帶之結合除了 GTTAC 序列以外，可能還需要 3-2 探針中其他序列之協助才能完成。GTGAC 則位於 3-2 與 3-3 上，與條帶 3b' 的結合有關，但只能在 3-3 探針上看到。我們推測可能因為 GTTAC 位於 3-2 序列的末端，而 3b' 分子的結合除了 GTGAC 外，還需要 3-3 的序列 (CAATT...)，因此在探針 3-2 上並沒有條帶 3b' 的存在。綜合以上結果，我們在 *CYP11A1* 啟動子-3400 至-3346 間找到至少有三個分子結合，可能為重要的潛在調控因子。

2. 轉錄因子之預測

利用數個轉錄因子結合位之分析軟體，我在 3 號探針上述重要序列上找到一些調控分子之候選者，標示於圖十二 A 序列上，結果如下：

a. CP1/NF-Y：

CP1/NF-Y 存在於許多組織，如肝臟 (Stewart, et al., 1996)。可辨認存在於許多不同基因啟動子內之 CCAAT box (Pallai et al., 2010; Ronchi et al., 1995; Wang et al., 1997)，與其結合進而調控該啟動子之基因轉錄。

b. NCAM (neural cell adhesion molecule)：

醣蛋白 NCAM 與 CP1/NF-Y 相同，可辨認 CCAAT box。表現這種醣蛋白的細胞會傾向於相互黏附，如神經細胞、神經膠細胞、骨骼細胞、自然殺手淋巴球

等 (Cunningham et al., 1987)。目前也有證據指出，其與細胞間的吸附、神經元突觸形成、神經突觸可塑性 (synaptic plasticity)、大腦學習與記憶形成等功能相關 (Muller et al., 1996; Stoenica et al., 2006)。

c. Oct-1 (Octamer transcription factor) :

Oct-1 廣泛表現於各組織中，可辨識序列如：CTCATGA、TAATGARAT，調控許多不同的基因表現，如 Gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) (Eraly et al., 1998)。也有研究指出 Oct-1 可作為壓力感受器，在細胞面臨外界壓力如缺氧或是飢餓時表現，進一步活化下游相關基因 (Tantin et al., 2005)。

d. Myb (myeloblastosis) :

Myb 可辨識 TAACGT 序列；其作為一轉錄調控因子，與血管新生關係密切，同時也與癌症的生成有關 (Vargova et al., 2011)，但與神經組織的關聯性並不明顯。

e. AP-1 (activator protein 1) :

AP-1 之辨識序列為 TGAC，可在細胞面臨各種外界刺激，如細胞素 (cytokine)、生長因子 (growth factor)、壓力或是病原感染等狀況時活化並調控下游基因表現 (Hess et al., 2004)，令細胞產生如分化、增生或是凋亡等不同的反應 (Ameyar et al., 2003)。

f. USF (upstream transcription factor) :

可辨識 E-box (CACGTGA)，在許多基因中都扮演重要的調控角色，也可與其他轉錄因子共同作用活化不同基因 (Corre and Galibert, 2005; Rada-Iglesias et al., 2008)，例如 *p53*、*APC*、*BRCA2*、*PTEN*、*SSeCKS* 等抑制癌症之基因 (Bu and Gelman, 2007; Corre and Galibert, 2005; Pezzolesi et al., 2007)，因此也被認為是一種腫瘤抑制因子。

二、*CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間序列 (5 號探針) 之分析結果

1. EMSA 結果

五號探針的 EMSA 結果顯示，使用嗅覺上皮細胞和蛋白質萃取物反應時觀察到的條帶與海馬迴或中腦之組別不盡相同，但是訊號都很微弱 (圖七)。然而將 5 號探針分段進行 EMSA 後卻在探針 5-3 出現明顯條帶。經由 5-3 點突變後做競爭反應的結果，我們認為 5-3 可能有兩個分子結合。條帶 5a 的結合現象似乎比 5b 明顯，但是突變 TTGGC 或 TGTAC 作為競爭者後都令 5b 變得較明顯，只是後者整體訊號較弱，且條帶 5b 有下降的現象，顯示 TTGGC 可能是影響 5b 分子結合的重要序列，而 TGTAC 則關聯性較低。突變 TAGAA 仍可競爭 5a、5b 與探針之結合，顯示 TAGAA 對 5a、5b 的分子結合並不重要。綜合以上結果，將可能的調控序列標示於圖十二 B。我們推論兩個分子結合位有部分重疊；TTGGC 影響條帶 5b 的結合，而條帶 5a 分子之結合位可能較接近 3' 端 (圖十二 B 5a、5b)。雖然無法確定確切的結合位置，但是在 *CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間的確存在重要的結合序列作為潛在的調控因子。

2. *CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間序列之結合位預測

同樣的我們也對 5 號探針進行了轉錄因子結合位的預測，結果如下：

a. CP1/NF-Y：

由於 5-3m2 突變前之序列便是 CCAAT box，因此預測之結果與前面相同。

b. NCAM (neural cell adhesion molecule)：

同前述。

c. GT-IIa :

屬於 GT-II 家族，可辨認 GCTGT 序列，活化某些植物基因的表現如 *PHYA* (Ni et al., 1996)；此外也有研究指出 GT-II 可與 SV-40 enhancer 結合調控基因的轉錄 (Xiao et al., 1987)。

三、體外轉殖方式之建立

以基因轉殖小鼠探討 *CYP11A1* 啟動子的調控耗時費力，因此我們想建立其他快速可行的組織基因轉入方法。由於在五天大之 SCC-Cre/R26R 基因轉殖幼鼠視網膜當中已經觀察到 4.4 kb *CYP11A1* 啟動子具有轉錄活性，我們想利用電穿孔轉染的方式，將質體轉入幼鼠視網膜組織中，觀察啟動子之轉錄活性。

圖十結果顯示，我們可以利用電穿孔方式成功地將外來基因轉入視網膜組織中，經由原代培養後使其表現；也證明在強啟動子 CMV 配合之下，Cre-loxP 系統可以應用在視網膜電穿孔轉染法研究啟動子活性。

但是當改用 *CYP11A1* 啟動子接 Cre 重組酶進行實驗時 (圖十一)，結果卻和使用不具任何啟動子的 iCre-polyA 載體相同，只有少數微弱的 LacZ 訊號。我們研判因為 *CYP11A1* 啟動子在視網膜的轉錄活性很低，在轉染效率低以及轉入數量少的狀況下，無法偵測到啟動子的活性。

除了視網膜，我們也嘗試直接將 DNA 以電穿孔方式轉入幼鼠之嗅覺上皮細胞，結果並未成功。

四、未來可進行之實驗

我們由 EMSA 反應結果觀察到 *CYP11A1* 啟動子上確實存在可與嗅覺上皮細胞核蛋白質結合的序列，但其是否真的扮演轉錄調控因子的角色，需要回到 in

vivo 層面做進一步的探討。由於我們無法成功將 CYP11A1 啟動子轉入視網膜組織表現，未來仍需利用基因轉殖小鼠模式，將潛在結合序列進行突變，觀察其是否影響啟動子的轉錄活性，如此一來便可確認這些序列對於 CYP11A1 啟動子於神經系統之調控是否重要。

針對 EMSA 的實驗結果，我們利用轉錄因子結合位預測工具進行了預測，若以可能性較高之結合分子的抗體進行 EMSA supershift reaction，觀察遷移現象是否改變，也可以進一步釐清可能的調控分子。此外也可利用 biotin 標定之探針進行結合反應，再進行蛋白質純化，以質譜儀 (mass spectrometry) 分析結合分子。



參考文獻

- Ameyar M, Wisniewska M, Weitzman JB. 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85(8):747-752.
- Baulieu EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23(8):963-987.
- Ben-Zimra M, Koler M, Melamed-Book N, Arensburg J, Payne AH, Orly J. 2002. Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 187(1-2):223-231.
- Bu Y, Gelman IH. 2007. v-Src-mediated down-regulation of SSeCKS metastasis suppressor gene promoter by the recruitment of HDAC1 into a USF1-Sp1-Sp3 complex. *J Biol Chem* 282(37):26725-26739.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. 2008. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* 19(8):300-307.
- Chiang YF, Lin HT, Hu JW, Tai YC, Lin YC, Hu MC. 2010. Differential regulation of the human CYP11A1 promoter in mouse brain and adrenals. *J Cell Physiol*.
- Chiang YF, Lin HT, Hu JW, Tai YC, Lin YC, Hu MC. 2011. Differential regulation of the human CYP11A1 promoter in mouse brain and adrenals. *J Cell Physiol* 226(8):1998-2005.
- Chou SJ, Lai KN, Chung B. 1996. Characterization of the upstream sequence of the human CYP11A1 gene for cell type-specific expression. *J Biol Chem* 271(36):22125-22129.
- Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS. 1994. Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134(3):1499-1508.
- Compagnone NA, Bulfone A, Rubenstein JL, Mellon SH. 1995. Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136(6):2689-2696.
- Compagnone NA, Mellon SH. 1998. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8):4678-4683.
- Compagnone NA, Mellon SH. 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21(1):1-56.
- Corre S, Galibert MD. 2005. Upstream stimulating factors: highly versatile

- stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18(5):337-348.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236(4803):799-806.
- Dubrovsky B. 2006. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 84(4):644-655.
- Eraly SA, Nelson SB, Huang KM, Mellon PL. 1998. Oct-1 binds promoter elements required for transcription of the GnRH gene. *Mol Endocrinol* 12(4):469-481.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52(4):513-556.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC. 2006. Steroids and glial cell function. *Glia* 54(6):485-498.
- Gizard F, Lavallee B, DeWitte F, Hum DW. 2001. A novel zinc finger protein TRP-132 interacts with CBP/p300 to regulate human CYP11A1 gene expression. *J Biol Chem* 276(36):33881-33892.
- Guarneri P, Guarneri R, Cascio C, Pavasant P, Piccoli F, Papadopoulos V. 1994. Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J Neurochem* 63(1):86-96.
- Guo IC, Hu MC, Chung BC. 2003. Transcriptional regulation of CYP11A1. *J Biomed Sci* 10(6 Pt 1):593-598.
- Guo IC, Huang CY, Wang CK, Chung BC. 2007. Activating protein-1 cooperates with steroidogenic factor-1 to regulate 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent human CYP11A1 transcription in vitro and in vivo. *Endocrinology* 148(4):1804-1812.
- Guo IC, Tsai HM, Chung BC. 1994. Actions of two different cAMP-responsive sequences and an enhancer of the human CYP11A1 (P450scc) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells. *J Biol Chem* 269(9):6362-6369.
- Harrison NL, Simmonds MA. 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323(2):287-292.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117(Pt 25):5965-5973.
- Hu MC, Chou SJ, Huang YY, Hsu NC, Li H, Chung BC. 1999. Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. *Endocrinology* 140(12):5609-5618.
- Hu MC, Hsu NC, Pai CI, Wang CK, Chung B. 2001. Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. *Mol Endocrinol* 15(5):812-818.

- Hu ZY, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. 1989. Neurosteroids: steroidogenesis in primary cultures of rat glial cells after release of aminoglutethimide blockade. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2):917-922.
- Huang N, Miller WL. 2000. Cloning of factors related to HIV-inducible LBP proteins that regulate steroidogenic factor-1-independent human placental transcription of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}. *J Biol Chem* 275(4):2852-2858.
- Hum DW, Staels B, Black SM, Miller WL. 1993. Basal transcriptional activity and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsiveness of the human cytochrome P450_{scc} promoter transfected into MA-10 Leydig cells. *Endocrinology* 132(2):546-552.
- Kay JN, Chu MW, Sanes JR. 2012. MEGF10 and MEGF11 mediate homotypic interactions required for mosaic spacing of retinal neurons. *Nature* 483(7390):465-469.
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. 2005. Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93(5):1220-1230.
- Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura H, Hojo Y, Takata N, Kawato S. 2001. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* 142(8):3578-3589.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressousches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu EE. 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268(5216):1500-1503.
- Kohchi C, Ukena K, Tsutsui K. 1998. Age- and region-specific expressions of the messenger RNAs encoding for steroidogenic enzymes p450_{scc}, P450_{c17} and 3β-HSD in the postnatal rat brain. *Brain Res* 801(1-2):233-238.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL. 1992. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6(8):1249-1258.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232(4753):1004-1007.
- Mellon SH, Deschepper CF. 1993. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res* 629(2):283-292.
- Mellon SH, Griffin LD. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab* 13(1):35-43.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. 2001. Biosynthesis and action of

- neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):3-12.
- Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 9(3):295-318.
- Miller WL. 2002. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* 198(1-2):7-14.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Hojo Y, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. 2006. Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84(4):255-263.
- Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, Rougon G, Kiss JZ. 1996. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17(3):413-422.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2):99-109.
- Ni M, Dehesh K, Tepperman JM, Quail PH. 1996. GT-2: in vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. *Plant Cell* 8(6):1041-1059.
- Pallai R, Simpkins H, Chen J, Parekh HK. 2010. The CCAAT box binding transcription factor, nuclear factor-Y (NF-Y) regulates transcription of human aldo-keto reductase 1C1 (AKR1C1) gene. *Gene* 459(1-2):11-23.
- Pezzolesi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C. 2007. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum Mol Genet* 16(9):1058-1071.
- Rada-Iglesias A, Ameer A, Kapranov P, Enroth S, Komorowski J, Gingeras TR, Wadelius C. 2008. Whole-genome maps of USF1 and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects of promoter structure and candidate genes for common human disorders. *Genome Res* 18(3):380-392.
- Ronchi A, Bellorini M, Mongelli N, Mantovani R. 1995. CCAAT-box binding protein NF-Y (CBF, CP1) recognizes the minor groove and distorts DNA. *Nucleic Acids Res* 23(22):4565-4572.
- Sanne JL, Krueger KE. 1995. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem* 65(2):528-536.
- Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghoumari A, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Ibanez C, Labombarda F, Coirini H, Baulieu EE, De Nicola AF. 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* 14

Suppl A:S18-33.

- Schumacher M, Sitruk-Ware R, De Nicola AF. 2008. Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Curr Opin Pharmacol* 8(6):740-746.
- Sher N, Yivgi-Ohana N, Orly J. 2007. Transcriptional regulation of the cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 gene (CYP11A1) revisited: binding of GATA, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating protein (AP)-1 proteins to a distal novel cluster of cis-regulatory elements potentiates AP-2 and steroidogenic factor-1-dependent gene expression in the rodent placenta and ovary. *Mol Endocrinol* 21(4):948-962.
- Shih MC, Chiu YN, Hu MC, Guo IC, Chung BC. 2011. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Mol Cell Endocrinol* 336(1-2):80-84.
- Slominski A, Ermak G, Mihm M. 1996. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab* 81(7):2746-2749.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21(1):70-71.
- Stoenica L, Senkov O, Gerardy-Schahn R, Weinhold B, Schachner M, Dityatev A. 2006. In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci* 23(9):2255-2264.
- Stromstedt M, Waterman MR. 1995. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res* 34(1):75-88.
- Tantin D, Schild-Poulter C, Wang V, Hache RJ, Sharp PA. 2005. The octamer binding transcription factor Oct-1 is a stress sensor. *Cancer Res* 65(23):10750-10758.
- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. 1998. Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139(1):137-147.
- Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obertlikova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T. 2011. MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117(14):3816-3825.
- Wang H, Jiang Z, Wong YW, Dalton WS, Futscher BW, Chan VT. 1997. Decreased CP-1 (NF-Y) activity results in transcriptional down-regulation of topoisomerase IIalpha in a doxorubicin-resistant variant of human multiple myeloma RPMI 8226. *Biochem Biophys Res Commun* 237(2):217-224.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40(3):333-336.
- Wu HS, Lin HT, Wang CK, Chiang YF, Chu HP, Hu MC. 2007. Human CYP11A1 promoter

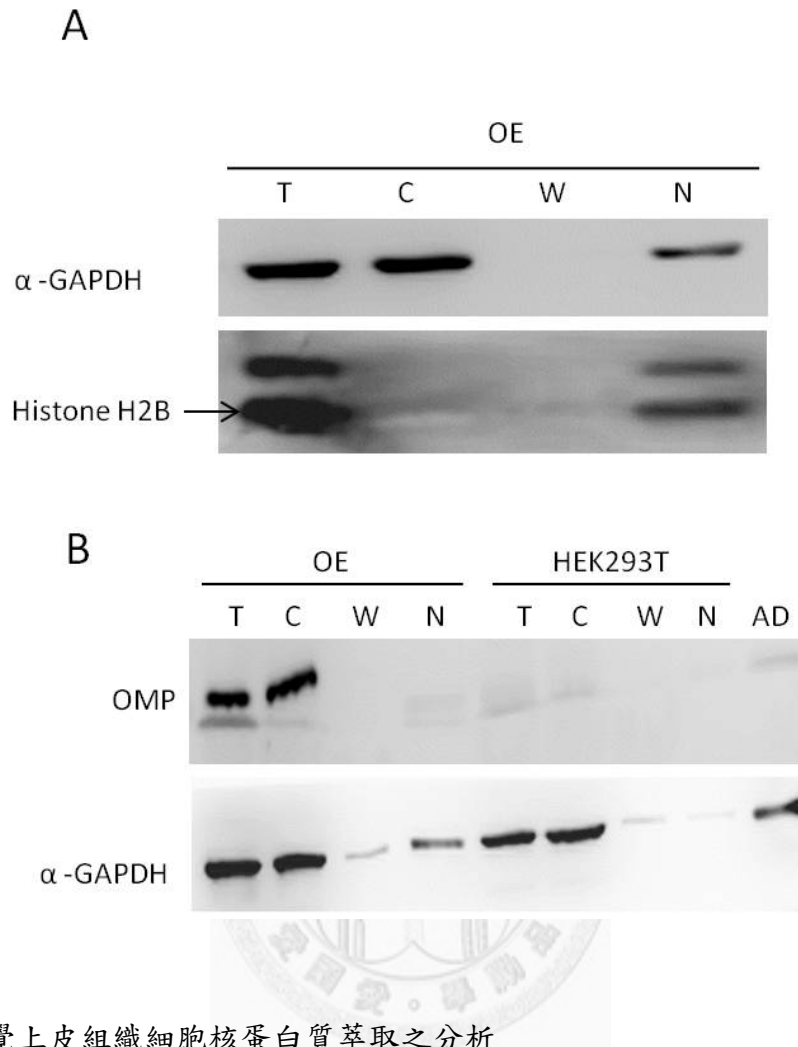
drives Cre recombinase expression in the brain in addition to adrenals and gonads. *Genesis* 45(2):59-65.

Xiao JH, Davidson I, Ferrandon D, Rosales R, Vigneron M, Macchi M, Ruffenach F, Chambon P. 1987. One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain B1 of the SV40 enhancer. *EMBO J* 6(10):3005-3013.

Zhang P, Rodriguez H, Mellon SH. 1995. Transcriptional regulation of P450scc gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. *Mol Endocrinol* 9(11):1571-1582.

Zhang Q, Liu Q, Austin C, Drummond I, Pierce EA. 2012. Knockdown of *ttc26* disrupts ciliogenesis of the photoreceptor cells and the pronephros in zebrafish. *Mol Biol Cell* 23(16):3069-3078.

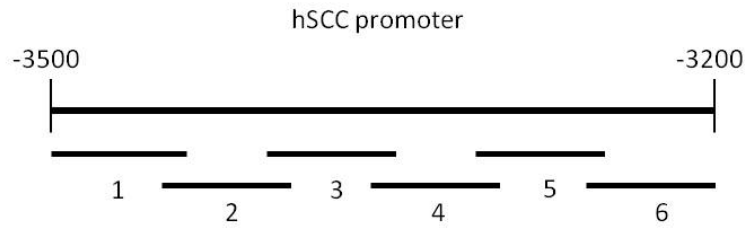




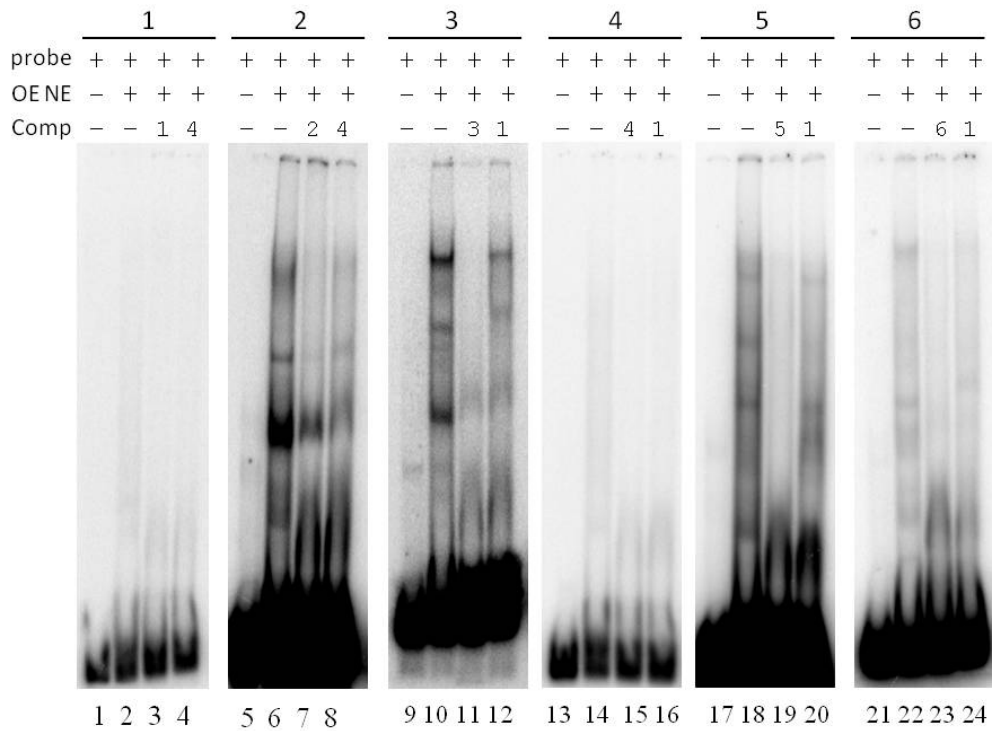
圖一、嗅覺上皮組織細胞核蛋白質萃取之分析

出生第八天之幼鼠，取嗅覺上皮組織，經磨碎後進行細胞核質分離，萃取細胞核蛋白質。分別取細胞質與細胞核蛋白質萃取液，進行西方墨點法分析。A. 以 anti-GAPDH 抗體辨識細胞質蛋白質，以 anti-Histone H2B 抗體辨識細胞核蛋白質。B. 以 anti-OMP 抗體確認位於嗅覺上皮細胞質之蛋白質。另以 HEK293T 細胞與腎上腺組織細胞蛋白質萃取物做為對照組。OE: olfactory epithelium; T: total cell lysate; C: cytoplasm extracts; W: wash buffer; N: nuclear extracts; AD: adrenal gland extracts。

A



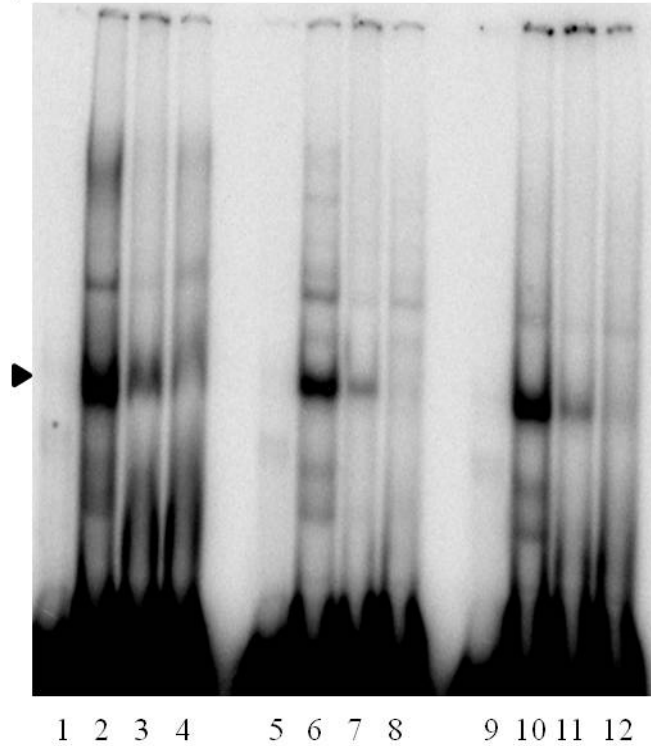
B



圖二、CYP11A1 啟動子-3.5k 與-3.2k 間之 DNA 序列 EMSA 分析

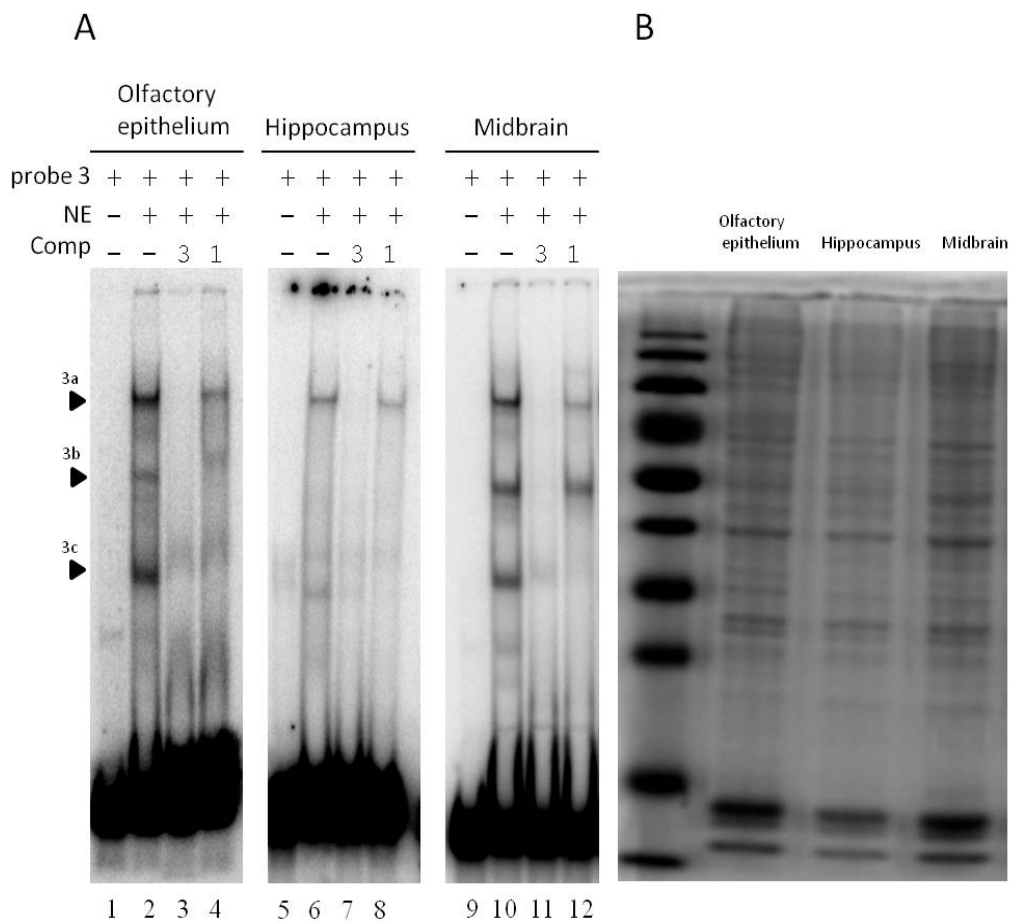
A. 將 CYP11A1 啟動子-3.5k 與-3.2k 間之 DNA 序列，分成六段合成寡核苷酸，做為 EMSA 反應之探針。B. 經放射性標定後之寡核苷酸探針，與嗅覺上皮組織核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量非放射性標定之寡核苷酸（標示於圖上）做競爭反應；與探針相同之寡核苷酸為專一性競爭者，不同之寡核苷酸為非專一性競爭者。OE NE：olfactory epithelium nuclear extracts；Comp：competitor。

	<u>Olfactory epithelium</u>				<u>Hippocampus</u>				<u>Midbrain</u>			
probe 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NE	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Comp	-	-	2	4	-	-	2	4	-	-	2	4



圖三、*CYP11A1* 啟動子-3447 與-3391 間之 DNA 序列 EMSA 反應

放射性標定之 2 號探針 (-3447~-3391) 分別與嗅覺上皮、海馬迴或中腦之細胞核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量非放射性標定之 2 號或 4 號寡核苷酸做專一性或非專一性競爭反應。箭頭表示探針遷移條帶。NE：nuclear extracts；Comp：competitor。



圖四、*CYP11A1* 啟動子-3400 與-3346 間之 DNA 序列 EMSA 反應

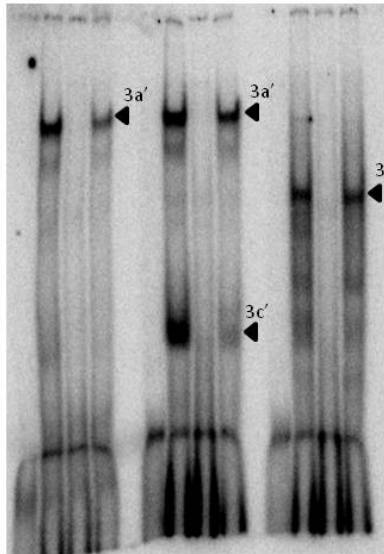
A. 放射性標定之 3 號探針 (-3400~-3346) 分別與嗅覺上皮、海馬迴或中腦之核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量之非放射性標定之 3 號或 1 號寡核苷酸做專一性或非專一性競爭反應。箭頭表示探針遷移條帶，依條帶位置分別編號為 3a、3b、3c。B. 嗅覺上皮細胞、海馬迴、中腦核蛋白質萃取液經 SDS-PAGE 電泳後，以 Coomassie Brilliant Blue 染劑偵測蛋白質含量。NE：nuclear extracts；Comp：competitor。

A

3 AGAGGCCTCC AATCAGTTAC ATCCAATGAA GGATTGATCC GTGACCAATT AGAGG
 3-1 AGAGGCCTCC AATCAGTTAC ATCCA
 3-2 GTTAC ATCCAATGAA GGATTGATCC GTGAC
 3-3 ATGAA GGATTGATCC GTGACCAATT AGAGG

B

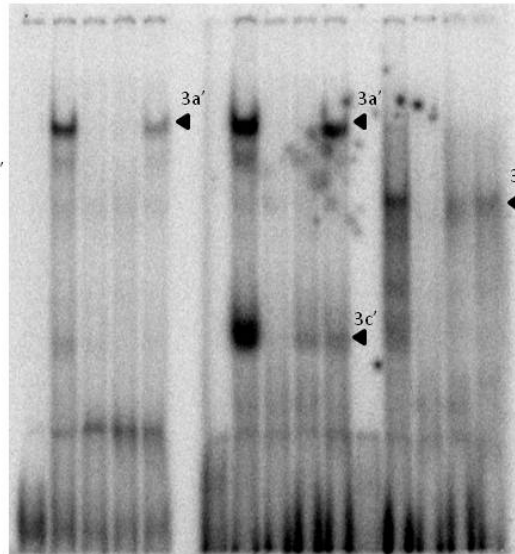
	3-1				3-2				3-3			
probe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OE NE	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Comp	-	-	3-1	CP	-	-	3-2	CP	-	-	3-3	CP



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

C

	3-1					3-2					3-3				
probe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OE NE	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Comp	-	-	3-1	3-2	3-3	-	-	3-2	3-1	3-3	-	-	3-3	3-1	3-2



13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

圖五、*CYP11A1* 啟動子-3400 與-3346 間分段之 DNA 序列 EMSA 反應

A. 將 3 號探針序列分成 3-1、3-2、3-3 三段，合成寡核苷酸做為 EMSA 反應之探針。B. 三段寡核苷酸探針經放射性標定後，與嗅覺上皮組織核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量非放射性標定之自身或 CP 寡核苷酸做專一性及非專一性競爭反應。CP 為 *CYP11A1* 啟動子 -121~-92 序列，含有 SF-1 結合位。C. 同 B，但競爭者改用非放射性標定之 3-1、3-2、3-3 寡核苷酸。箭頭表示探針遷移條帶，依條帶位置分別編號為 3a'、3b'、3c'。OE NE：olfactory epithelium nuclear extracts；Comp：competitor。

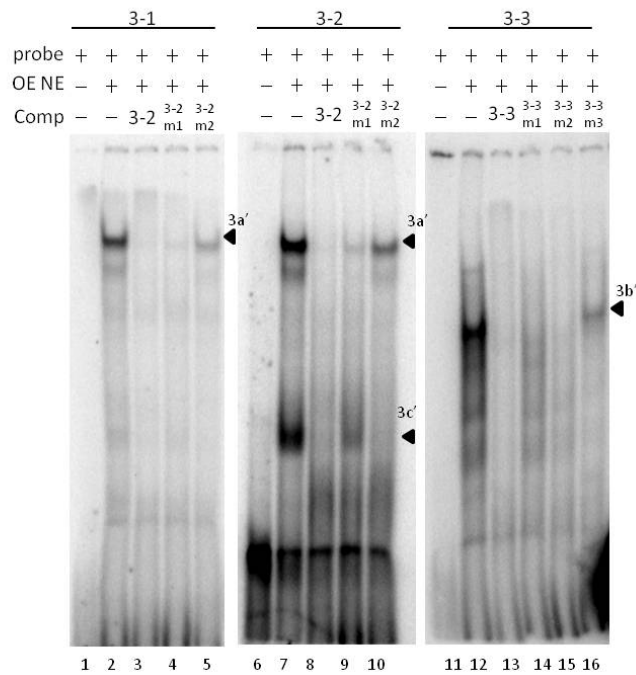
A

```

3-2wt  GTTACATCCA ATGAAGGATT GATCCGTGAC
3-2m1  agggg-----
3-2m2  -----ggggg

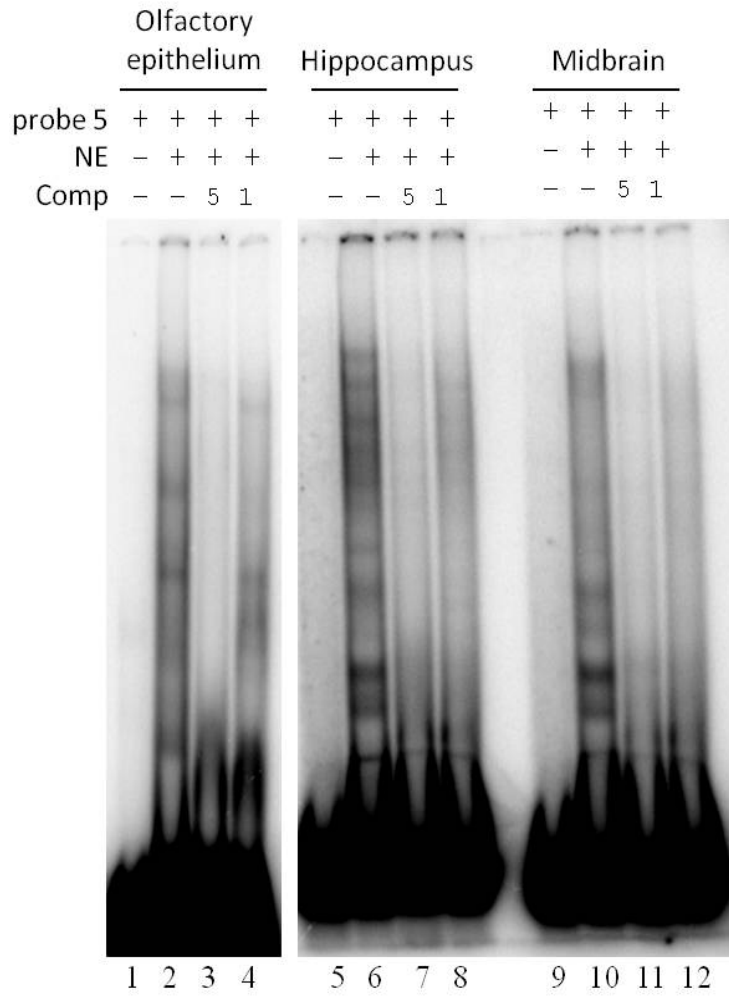
3-3wt  ATGAAGGATT GATCCGTGAC CAATTAGAGG
3-3m1  ----- ggggg-----
3-3m2  ----- ttttt
3-3m3  ----- aaaga -----
  
```

B



圖六、*CYP11A1* 啟動子-3400 與-3346 間序列經定點突變後之 EMSA 反應

A. 將 3-2、3-3 做定點突變合成寡核苷酸做為 EMSA 反應之競爭者。小寫字母為突變後之序列；3-2 與 3-1 重疊之序列以底線標記；3-2 與 3-3 重疊之序列以波浪底線標記。B. 放射性標定之 3-1、3-2、3-3 探針與嗅覺上皮組織核蛋白質進行凝膠遷移反應。加入 100 倍量野生型或突變之 3-2、3-3 非放射性標定寡核苷酸做競爭反應。箭頭表示探針遷移條帶，依條帶位置分別編號為 3a'、3b'、3c'。OE NE : olfactory epithelium nuclear extracts ; Comp : competitor 。



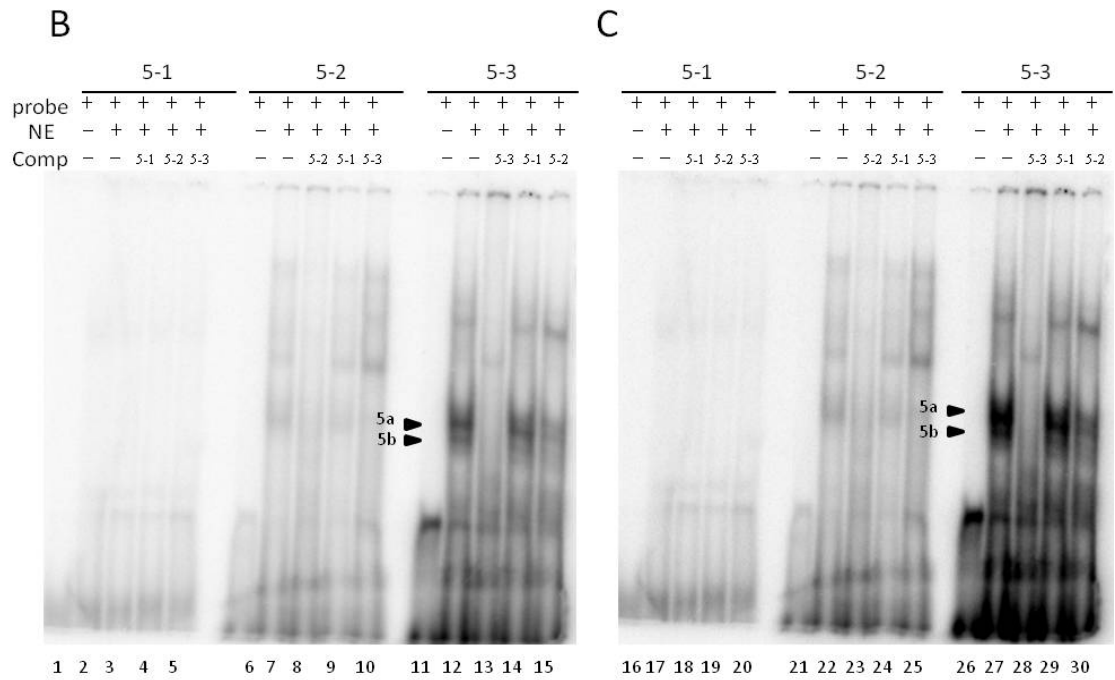
圖七、*CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間之 DNA 序列 EMSA 反應

放射性標定之 5 號探針 (-3305~-3247 序列) 分別與嗅覺上皮、海馬迴或中腦之核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量非放射性標定之 5 號或 1 號寡核苷酸做專一性或非專一性競爭反應。NE：nuclear extracts；Comp：competitor。

A

```

5  GATGTGGCCT GTATGTTGCC TAATCCTGCC TAGAATTGGC TGTACCTGCT GTGCCTTTT
5-1 GATGTGGCCT GTATGTTGCC
5-2          GTATGTTGCC TAATCCTGCC TAGAATTGGC
5-3                                TAGAATTGGC TGTACCTGCT GTGCCTTTT C
  
```



圖八、*CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間分段之 DNA 序列 EMSA 反應

A. 將 5 號探針序列分成 5-1、5-2、5-3 三段，合成寡核苷酸做為 EMSA 反應之探針。B. 探針經放射性標定後，與嗅覺上皮組織核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量非放射性標定之 5-1、5-2、5-3 寡核苷酸做競爭反應。C. 實驗同 B，但改以海馬迴核蛋白質進行反應。箭頭表示探針遷移條帶，依條帶位置編號為 5a、5b。OE NE：olfactory epithelium nuclear extracts；Comp：competitor。

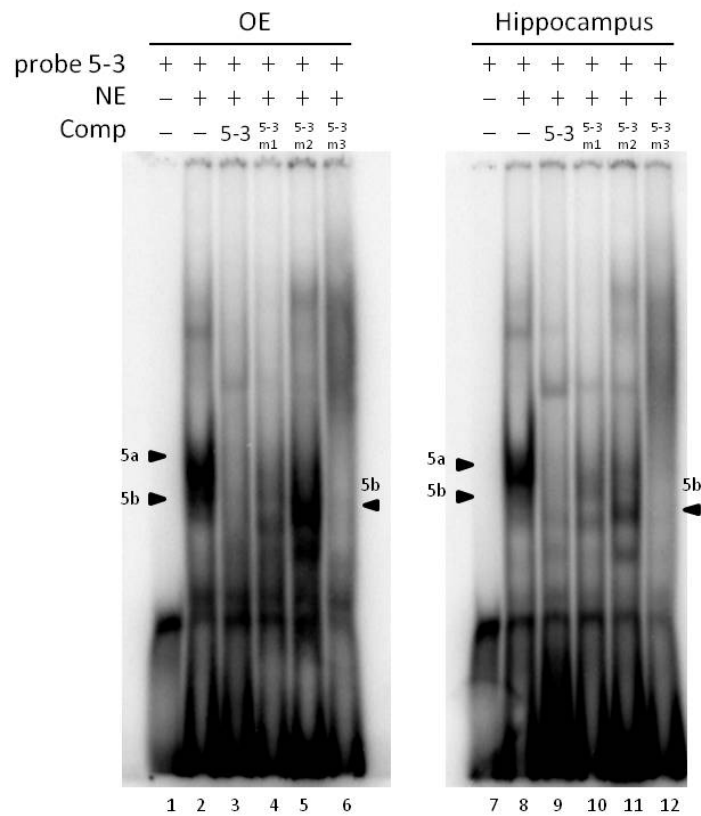
A

```

5-3wt  TAGAATTGGC TGTACCTGCT GTGCCTTTTG C
5-3m1  ----- aaaga-----
5-3m2  -----aaaaa-----
5-3m3  ccccc-----

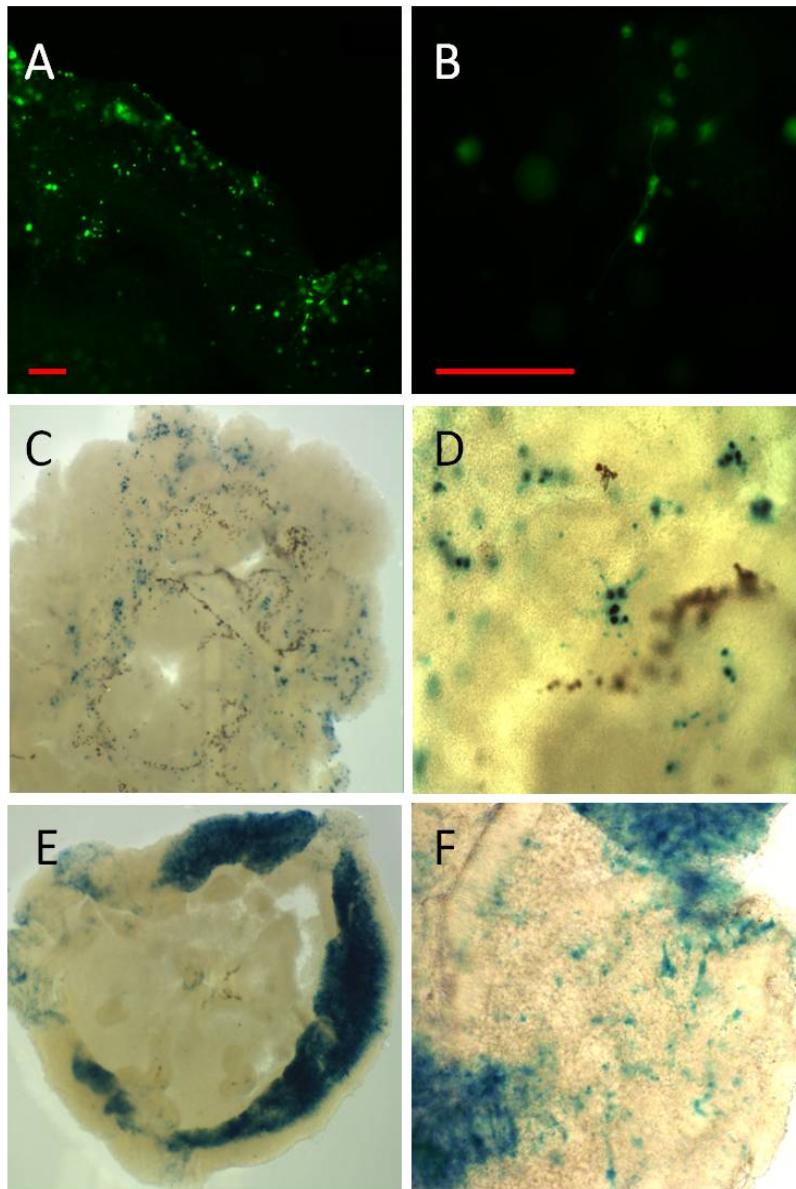
```

B



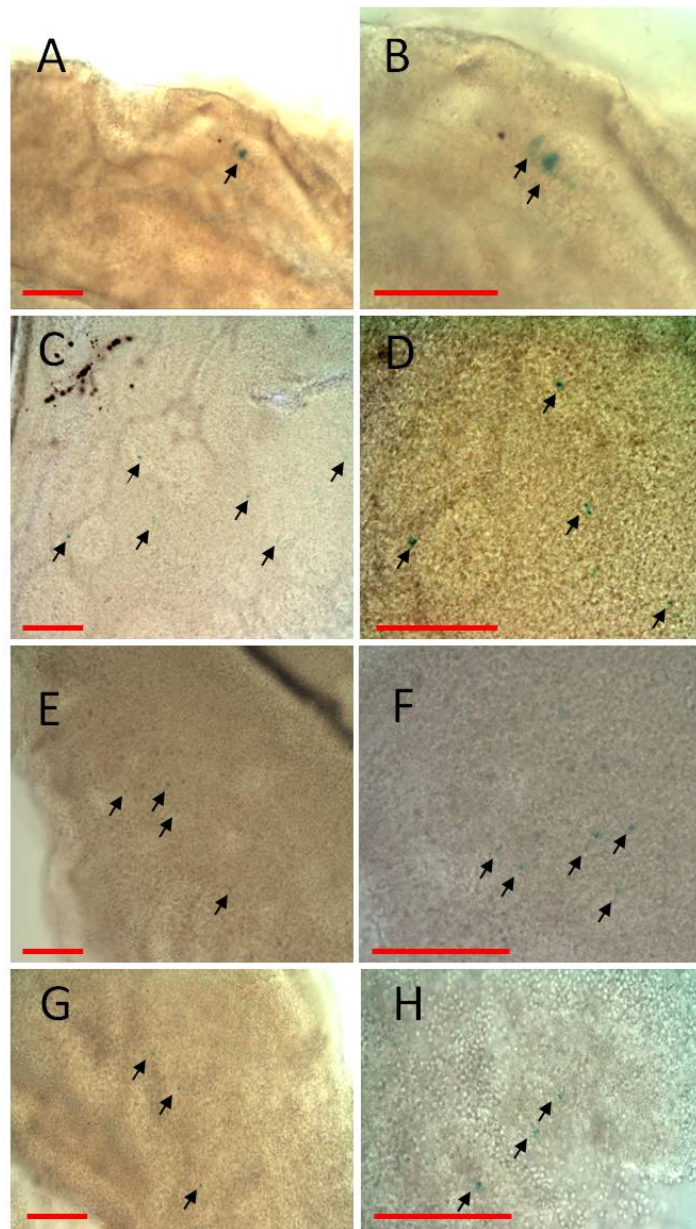
圖九、*CYP11A1* 啟動子-3305 與-3247 間序列經定點突變後之 EMSA 反應

A. 將探針 5-3 做定點突變合成寡核苷酸做為 EMSA 反應之競爭者。小寫字母為突變後之序列；5-2 與 5-3 重疊之序列以底線標記。B. 放射性標定之 5-3 寡核苷酸探針與嗅覺上皮組織(左)或海馬迴(右) 核蛋白質進行 EMSA 反應。加入 100 倍量野生型或突變之 5-3 非放射性標定寡核苷酸做競爭反應。箭頭表示探針遷移條帶，依條帶位置編號為 5a、5b。NE：nuclear extracts；Comp：competitor。



圖十、視網膜電穿孔轉染法之建立

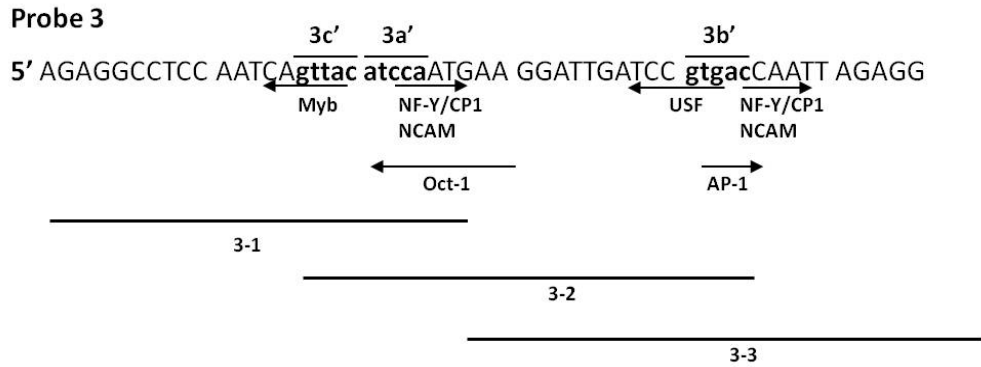
取 2 天大之幼鼠視網膜 (E、F 為 ROSA26R 幼鼠)，以電穿孔轉染法將 CMV 啟動子驅動報導基因之質體 pCMV-EGFP (A、B)、pCMV- β gal (C、D) 或 pCMV-iCre (E、F) 轉染入視網膜中。原代培養 4 至 5 天後，利用顯微鏡觀察螢光訊號 (A、B) 或 X-gal 酵素活性染色 (C~F) 之結果，其中 C、E 為解剖顯微鏡下觀察之影像。Scale bar 為 100 μ m。



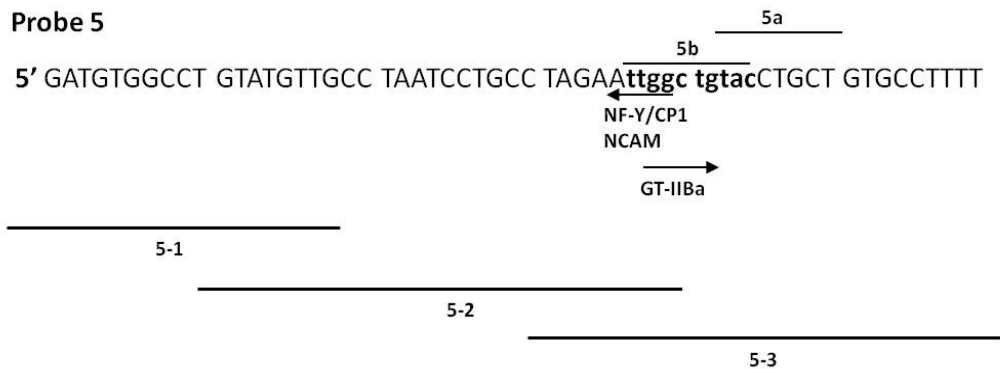
圖十一、視網膜電穿孔轉染法分析 *CYP11A1* 啟動子之活性

將 *CYP11A1* 啟動子接上 Cre 重組酶，以電穿孔轉染入 ROSA26R 幼鼠視網膜中。原代培養 4 至 5 天後經 X-gal 酵素活性染色於光學顯微鏡下觀察。A、B 為 4.4 kb 長度之啟動子；C、D 為 3.5 kb 長度之啟動子；E、F 為 3.2 kb 長度之啟動子；G、H 為載體 piCre-polyA 作為對照組。箭號表示有呈色之細胞。Scale bar 為 100 μ m。

A



B



圖十二、*CYP11A1* 啟動子之轉錄因子結合位預測

A. 3 號探針 (-3400 至-3346)之預測結果。B. 5 號探針 (-3305 至-3247)之預測結果。小寫字母為以 EMSA 結果推測之潛在分子結合位。箭號為預測之轉錄因子結合位。

表一、視網膜電穿孔轉染法之測試

將各種測試用之質體以電穿孔轉染入幼鼠視網膜中，原代培養4至5天後觀察該質體表現程度並記錄每一種轉染質體之實驗次數、視網膜樣本數以及有表現轉染質體之樣本數。

質體	實驗次數	樣本數	表現之樣本數
CMV-eGFP	3	16	12
CMV- β -galactosidase	2	8	8
CMV-iCre	2	4	4
hScc4.4k-iCreIn	4	19	8
hScc3.5k-iCreIn	3	12	8
hScc3.2k-iCreIn	3	10	4
iCre-polyA	2	4	4
none	2	4	0