

東海大學化學系研究所

碩士論文

The analysis of tafazzin knockout and restoration
on mitochondrial cardiolipin

Tafazzin 基因剔除和修復對粒線體心磷脂的變異
分析

指導教授：許員豪 教授

研究生：朱怡

中華民國一〇七年一月

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 朱怡君 所提之論文

Tafazzin 基因剔除和修復對粒線體心磷脂
的變異分析

The analysis of tafazzin knockout and restoration
on mitochondrial cardiolipin

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 許員家 (簽章)

107 年 1 月 15 日

東 海 大 學 碩 士 班 研 究 生
論 文 口 試 委 員 審 定 書

化學系 碩士班 朱怡君 所提之論文

Tafazzin 基因剔除和修復對粒線體心磷脂
的變異分析

The analysis of tafazzin knockout and restoration
on mitochondrial cardiolipin

論文口試委員會 召集人 魏鳳屏 (簽章)

委 員 許員

黃廣榮

中 華 民 國 107 年 1 月 15 日

東海大學化學系研究所

碩士論文

The analysis of tafazzin knockout and restoration
on mitochondrial cardiolipin

Tafazzin 基因剔除和修復對粒線體心磷脂的變異

分析

指導教授：許員豪 教授

研究生：朱怡

中華民國一〇七年一月

致 謝

在研究所的歲月，首當感謝我的指導教授許員豪博士，雖然我不是一位非常傑出的學生，但是在老師細心的教導與不厭其煩的指引下，讓我能夠有所成長與突破，使得本論文得以順利的完成，在此謹敬上最高的謝意與感激。此外口試期間，承蒙龍鳳娣教授以及黃廣慈助理教授提供許多寶貴的意見，使本論文更臻完備，在此一併致上崇高的敬意。

其次，感謝所上諸位老師對我的教導；研究夥伴—賴冠霖、吳庭遠以及在學期間和在學期間學長趙昱任、學弟陳映志與學妹賴若莖與饒育寧，與你們共度的時光讓我研究生活更加美好與充實。另外感謝大學時期的好友們，在這求學期間有你們陪伴使我的生活更多彩多姿。再來還要感謝在台北的好朋友們，雖然這段期間並不常見面，但是有你們的關心與打氣，讓我更有動力能在繁忙的課業中順利渡過。

另外特別感謝幾位我最重要的貴人—陳若予與陳力慈，當我心情陷入低潮時是你們給予我支持與鼓勵，讓我學會成長並讓我充滿勇氣更加堅強與更勇敢的去面對一切困境，沒有你們也就沒有今天的我，謝謝你們，你們是我一生中永遠最棒的好朋友。

最後，我要感謝我的父母以及家人，有你們細心栽培與照顧，讓我無後顧完成學業，我的成就應該也是你們的驕傲。謹以此篇論文獻給我的師長以及所有關愛我的人，謝謝你們。

朱怡 2018年1月

謹誌於 台中私立東海大學化學系

目錄

目錄.....	I
摘要.....	IV
Abstract.....	VI
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
第一章、緒論.....	1
1.1 TAZ 基因相關巴氏綜合症 Barth syndrome (BTBS).....	1
1.2 TAZ 基因細胞模型與 CL 組成.....	1
1.3 Tafazzin 與 CL 關聯.....	3
1.4 心磷脂 Cardiolipin (CL).....	4
1.5 CL 合成與水解相關路徑.....	6
1.6 粒線體活性偵測.....	7
1.7 研究動機.....	9
第二章 實驗材料與方法.....	10
2.1 Hap1 細胞和 Δ TAZ 細胞培養.....	10
2.2 利用 Megabase-scale CRISPR/Cas9 將細胞 TAZ 基因 knockout.....	10
2.3 Hap1 細胞和 Δ TAZ 細胞蛋白質定量.....	10
2.4 抽提 mRNA.....	11
2.5 mRNA 轉 cDNA.....	11
2.6 Real-time quantitative PCR.....	11

2.7 粒線體活性測定.....	11
2.8 使用 Tafazzin plasmid 轉染轉染 Hap1 Δ TAZ 細胞.....	12
2.9 西方墨點法 Western blot.....	12
2.10 使用 TEM 觀察 Hap1 細胞和 Δ TAZ 細胞.....	13
2.11 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG(18:1) ₂	14
2.12 脂質萃取 Bligh Dyer.....	14
2.13 固相萃取 SPE.....	14
2.14 脂質樣品分析.....	14
第三章、結果.....	16
3.1 TEM 電子顯微鏡.....	15
3.2 海馬能量測定儀.....	17
3.3 Hap1 和 Δ TAZ 細胞 CL 之 LC MS 圖.....	18
3.3.1 心磷脂鑑定.....	18
3.3.2 Cardiolipin 定量分析.....	20
3.3.3 Hap1 細胞和 Δ TAZ 細胞 CL 與 MLCL 總量.....	23
3.3.4 Hap1 細胞與 Δ TAZ 細胞 CL 組成之影響.....	24
3.4 RT-PCR.....	25
3.4.1 CL 合成與 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量.....	26
3.4.2 CL 水解和細胞發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量.....	27
3.4.3 能量代謝與細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量.....	27
3.5 Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 後使用 Western Blot 偵測蛋白轉染.....	28

3.6 Hap1 Δ TAZ 細胞經轉染 TAZ 後鑑定 CL 之 LC MS 圖.....	30
3.6.1 Hap1 Δ TAZ 細胞經轉染 TAZ 對 CL 組成之定量分析.....	30
3.6.2 Hap1 Δ TAZ 細胞經轉染 TAZ 後 MLCL 組成之定量分析.....	31
3.7 CL 重塑與與能量代謝和發炎反應與細胞凋亡相關 mRNA 表達量.....	31
3.7.1 CL 合成與水解和重塑相關 mRNA 表達量.....	32
3.8 Hap1 和 Δ TAZ 細胞添加 PG 後細胞 CL 與 MLCL 總量.....	33
3.8.1 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 後對 CL 組成之定量分析.....	34
3.8.2 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 後對 MLCL 組成之定量分析.....	35
3.9 添加 PG 之 CL 合成、重塑、水解與能量合成相關 mRNA 表達量.....	36
3.9.1 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 之細胞凋亡與發炎相關 mRNA 表達.....	37
3.9.2 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 之 CL 水解相關 mRNA 表達量.....	38
第四章、討論.....	39
參考文獻.....	41

摘要

巴氏綜合症 (Barth syndrome) 為一種心磷脂 (Cardiolipin, CL) 異常造成的粒線體相關疾病。現今使用多種細胞模型作為研究，然而細胞粒線體機制上的研究尚不明確。本實驗使用 Hap1 人類類纖維單倍染色體細胞，將細胞中 TAZ (Tafazzin) 剔除作為 Δ TAZ 細胞模型。我們利用電子顯微鏡觀察發現細胞粒線體形狀產生泡狀變異。當以海馬能量測定細胞基礎耗氧率發現 Hap1 Δ TAZ 細胞粒線體功能降低。利用質譜鑑定 CL 與單水解心磷脂 monolyso-Cardiolipin (MLCL) 組成，發現 Δ TAZ 細胞 CL 合成含量降低而 MLCL 含量增加，且 CL 組成也產生變異。TAZ 剔除後，細胞中 CL68:2 及 CL70:3 明顯提高。不同基因調控影響 CL 組成，定量 Δ TAZ 細胞 mRNA 表現量磷脂醯甘油合成酶 *PGS1* (Phosphatidylglycerophosphate synthase 1) 降低，導致 Δ TAZ 細胞無法足夠合成 PG 以供 CL 合成。CL 水解相關基因 *PLA2G6* (Phospholipase A₂ group VI, transcript variant 2) 和 *PNPLA8* (Patatin like phospholipase domain containing 8) 表達量增加導致 Δ TAZ 細胞 MLCL 累積。接著我們嘗試將 TAZ 基因轉染到 Δ TAZ 細胞，以測試其基因剔除後的恢復狀態。使用質譜儀觀察 CL70:3 與 CL70:2 和 CL72:4 與 CL72:3 含量皆減少。證實 TAZ 醯基轉移酶恢復重塑 CL，將飽和 CL 連接醯基鏈置換成不飽和的(18:1)醯基鏈，但也使飽和心磷脂總含量降低。定量粒線體相關蛋白 mRNA 表現量後，發現 CL 合成基因 *CRLS1* (Cardiolipin synthase) 增加，可見 CL 的缺乏已刺激細胞合成新 CL。因為我們發現 TAZ 基因剔除導致 PG 合成酶表達下降，PG 合成降低，因此添加 PG(18:1)₂ 作為 CL 合成的原料。鑑定細胞 CL 與 MLCL 組成發現由 18:1 醯基鏈的 CL 含量皆增加，證實 PG(18:1)₂ 參與 CL 合成。水解 CL 基因 *PLA2G6* 與 *PNPLA8* 基因表達量皆降低，為 CL 含量增加之因素。

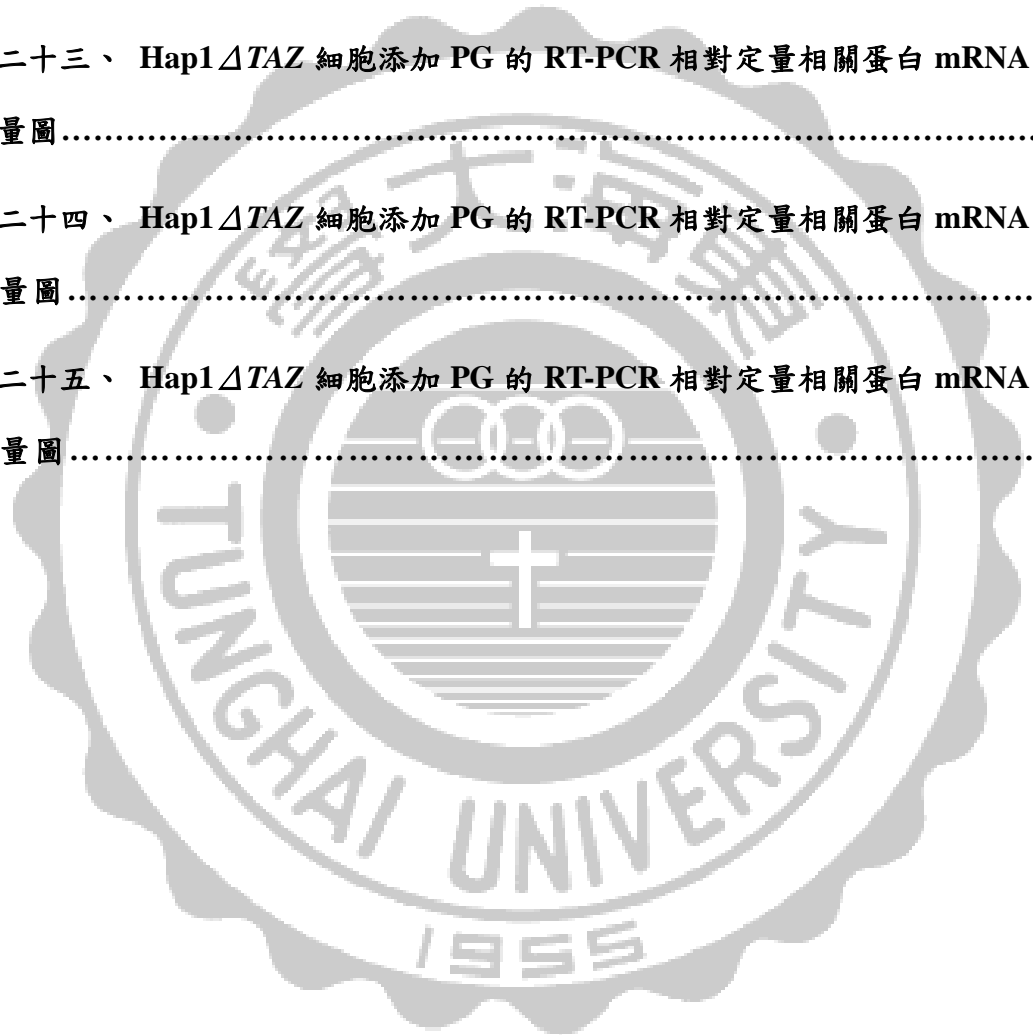
Abstract

Barth syndrome (BTHS) can cause the abnormality of cardiolipin (CL). Even though there are multiple cellular models available, the detailed mechanism is still not clear. The human fibroblast haploid cells (Hap1 cell) were selected as our cellular model. By applying mass spectrometry (MS) to identify the components of CL and monolyso-Cardiolipin (MLCL), we discovered that CL synthesis decreased, while MLCL synthesis increased in the Hap1 Δ TAZ cell. CL68:2 and CL70:3 have significant increase in total CL. By quantifying the mRNA expression of Hap1 Δ TAZ cell, we found the gene expression of *PGS1* (phosphatidylglycerophosphate synthase 1) decreased, indicating that the Δ TAZ cell might not have enough PG for CL synthesis. Upon the increase of the expression of CL hydrolysis related genes, *PLA2G6* (phospholipase A₂ group VI, transcript variant 2) and *PNPLA8* (patatin like phospholipase domain containing 8) showed a cumulative increase in MLCL in the Δ TAZ cell. When we attempted to transfect *TAZ* gene into Δ TAZ cell to recover cell, the quantity of CL70:3, CL70:2, CL72:4 and CL72:3 were all decreased. We discovered that the gene expression of *CRLS1* (cardiolipin synthase) increased, which can stimulate CL synthesis. When *TAZ* was knocked out, the expression of PG synthase decreased. Therefore, adding 50 μ M of PG (18:1)₂ can stimulate CL synthesis. We discovered that the CL content of the 18:1 acyl chains and total CL quantity increased, confirming PG (18:1)₂ was involved in CL synthesis. Gene down-regulation of both *PLA2G6* and *PNPLA8*, which decreased the overall hydrolysis of CL and can be the main reason for the increase of CL concentration.

圖目錄

圖一、心磷脂結構.....	5
圖二、心磷脂的合成與水解.....	6
圖三、海馬生物能量測定儀分析粒線體呼吸作用.....	7
圖四、電子顯微鏡觀察 Hap1 細胞切片圖.....	15
圖五、電子顯微鏡觀察 Hap1 Δ TAZ 細胞切片圖.....	16
圖六、海馬生物能量測定儀分析 Hap1 和 Δ TAZ 細胞粒線體耗氧率.....	17
圖七、Hap1 和 Δ TAZ 細胞中 CL 與 MLCL 質譜圖.....	18
圖八、質譜鑑定 Hap1 和 Δ TAZ 細胞中 CL 組成圖.....	19
圖九、CL species 與 MLCL species 總含量變化圖.....	23
圖十、Hap1 細胞和 Δ TAZ 細胞 24 種 CL 的組成.....	24
圖十一、RT-PCR 相對定量 CL 合成與 CL 重塑相關蛋白 mRNA 表達量.....	26
圖十二、RT-PCR 相對定量 CL 重塑相關蛋白 mRNA 表達量.....	27
圖十三、RT-PCR 相對定量 CL 能量代謝與細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量 圖.....	28
圖十四、利用西方墨點法偵測轉染 TAZ 後的 Δ TAZ 細胞質.....	29
圖十五、Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 之 CL 與 MLCL 總量圖.....	29
圖十六、Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中 24 種 CL 組成比率圖.....	30
圖十七、Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中 20 種 MLCL 組成比率圖.....	31
圖十八、Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 的 RT-PCR 相對定量相關蛋白 mRNA 表達 量圖.....	32

圖十九、 Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 的 RT-PCR 相對定量相關蛋白 mRNA 表達量圖.....	33
圖二十、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 後細胞中 CL 與 MLCL 總量圖.....	34
圖二十一、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 的中 24 種 CL 組成比率圖.....	35
圖二十二、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 的 20 種 MLCL 組成圖.....	36
圖二十三、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 的 RT-PCR 相對定量相關蛋白 mRNA 表達量圖.....	36
圖二十四、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 的 RT-PCR 相對定量相關蛋白 mRNA 表達量圖.....	37
圖二十五、 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 的 RT-PCR 相對定量相關蛋白 mRNA 表達量圖.....	38



表目錄

表一、 質譜儀參數設定.....	15
表二、 HAP1 細胞和 ΔTAZ 細胞中 CL 種類.....	22
表三、 HAP1 ΔTAZ 細胞中 MLCL 種類.....	23
表四、 Real-time quantitative PCR 引子設計.....	26



第一章、緒論

1.1 TAZ 基因相關巴氏綜合症 Barth syndrome (BTHS)

巴氏綜合症 Barth syndrome (BTHS) 是位於性染色體上 Xq28 的遺傳性疾病，通常來自母親的 X 染色體遺傳。其症狀為左心室心肌生長不完全導致的心肌病或是心肌纖維化造成先天性肌肉萎縮，和嗜中性白血球降低 (Neutropenia)，影響患者新陳代謝、骨骼肌病變、生長遲緩與運動耐受不良 (Exercise intolerance)、三甲基戊二酸血症 (3-Methylglutaconic Aciduria) 或造成心磷脂 Cardiolipin (CL) 異常等多系統疾病，甚至導致新生兒死亡¹。巴氏症患者的心肌細胞和骨骼肌與 CL 的重塑有很大關連，粒線體內膜 CL 含量減少，而 CL 經水解形成的單水解心磷脂 monolyso-Cardiolipin (MLCL) 含量則相對上升，因此以單水解心磷脂除以心磷脂 monolyso-Cardiolipin/Cardiolipin (MLCL/CL) 數值作為診斷巴氏綜合症方法²。巴氏症患者心肌細胞 CL 種類分佈影響皆由 TAZ 基因測序證實，且 Tafazzin 突變序列已建立於數據資料庫^{3,4}。相關研究酵母菌中 YPR140w 基因 (TAZ1) 與人類 TFAZZIN 基因 (TAZ) 為同源基因⁵。當患者缺乏 TAZ 基因時，MLCL 無法進行醯基轉移酶形成具有功能性的 CL，使 MLCL 累積造成 MLCL 含量上升，其中研究發現 MLCL(16:0)(18:1)₂ 組成含量較正常細胞上升約 70 倍⁶。由於目前醫療技術並無徹底的治癒方法，僅針對臨床症狀治療、心臟病給予藥物控制及嗜中性白血球減少導致的感染問題給予抗生素⁷。

1.2 TAZ 基因模型與 CL 組成

現今研究中除了使用 BTHS 患者細胞作為模型外，還有許多相關的細胞模型。例如剔除 TAZ 基因小鼠細胞模型，研究發現小鼠心肌細胞及骨骼肌中 CL 總量降低，長碳鏈 CL72:8 由 CL(18:2)₄ 組成的心磷脂減少約 30 倍，而 MLCL 54:6 組成含量比正常小鼠增加約 2 倍。或是使用 TAZ 基因剔除大鼠細胞，發現醯基鏈(16:1) 與醯基鏈(18:2) 的 CL 組成含量比野生型大鼠細胞低⁸。在野生型小鼠與剔除 TAZ

基因小鼠心肌做比較，發現剔除 *TAZ* 基因小鼠 CL72:8 與 CL72:7 含量極低，而短碳鏈 C54:4 和 C52:2 組成的 MLCL 含量較多。在野生型小鼠骨骼肌中發現由 C72:8、C72:7 和 C72:6 長碳鏈組成的 CL 含量極高，而 *TAZ* 基因剔除型小鼠骨骼肌中則是中碳鏈 CL68:2 含量最多⁹。使用 *TAZ* 基因剔除導致心臟衰退的斑馬魚模型，不過研究中沒有特別對 CL 組成進行分析¹⁰。使用 *TAZ* 基因剔除導致飛行功能受損果蠅及夜蛾的昆蟲模型，經過質譜鑑定 CL 分子量為 1396 *m/z*，分析原生型果蠅細胞心磷脂組成 CL(16:1)₂(18:1)₂ 比基因剔除果蠅細胞含量多，而在剔除果蠅細胞中經過鑑定分子量 1400 *m/z* 的心磷脂，其組成為 (16:0)(16:1)(18:1)(18:2)，含量則比原生型果蠅多¹¹。研究中指出 *TAZ* 基因剔除夜蛾與 *TAZ* 基因剔除型果蠅，發現昆蟲細胞中的磷脂膽鹼 (PC) 與腦磷脂 (PE) 和原生型夜蛾與原生型果蠅昆蟲細胞模型相比差異皆不大，且 CL 偏向由醯基鏈 (18:1) 與醯基鏈 (16:1) 組成。在野生型夜蛾細胞中由醯基鏈 (16:1) 組成的心磷脂含量佔 80%，由醯基鏈 (18:1) 組成的心磷脂含量則是約 10%，而在剔除 *TAZ* 基因之夜蛾細胞中則發現由醯基鏈 (18:1) 組成的心磷脂佔 50%，由醯基鏈 (16:1) 組成的心磷脂含量則佔 30%，且 CL 含量比野生型細胞低，研究觀察果蠅細胞與夜蛾細胞心肌中 MLCL 除以 CL 含量皆比骨骼肌中的 MLCL 除以 CL 含量數值高，證實 *TAZ* 剔除細胞模型的心肌中的 MLCL 含量比骨骼肌多^{12,13,14}。也有使用 *cld1* 野生型酵母菌作為細胞模型，分析其 CL 組成發現偏向由醯基鏈 (16:0)，而不是一般常見的醯基鏈 (16:1) 及醯基鏈 (18:1) 心磷脂組成^{15,16}。

1.3 Tafazzin 與 CL 關聯

1996 年首次發現存在於染色體 Xq28 上的人類 *TAZ* 基因，Tafazzin 蛋白存在生物合成能量的粒線體內外膜上，在心肌中與骨骼肌中大量表達，Tafazzin 蛋白作用與醯基轉移酶 (acyltransferases) 的機制相似，可以進行合成或修飾磷脂質上的醯基鏈，因此和 CL 的重塑途徑有很大的關聯，且 Tafazzin 蛋白缺陷會造成

巴氏綜合症^{16-17,18}。由於缺乏 *TAZ* 基因導致細胞突變已經被判斷為巴氏綜合症患者
的主因，造成 CL 組成的脂肪酸鏈異常，甚至降低 CL 含量和造成 MLCL 累積¹⁹。
早期研究以酵母菌作為細胞模型，酵母菌本身含有 Tafazzin 蛋白，因此當酵母菌
突變時會抑制 *TAZI* 表達，造成 CL 代謝和粒線體功能障礙等症狀類似 BTHS
患者，且研究中發現缺乏 *TAZ* 基因的突變酵母菌氧化物增加造成酵母菌的 CL 氧
化壓力上升²⁰。Tafazzin 蛋白是粒線體內膜中與 CL 組成相關的醯基轉移酶，因
此 *TAZ* 基因突變會影響生物體內的能量合成，甚至造成粒線體功能和型態的異
常^{21,22,23}。

1.4 心磷脂 Cardiolipin (CL)

心磷脂 (1,3-diphosphatidyl-*sn*-glycerol, Cardiolipin, CL) 由 Mary Pangborn
於 1942 年在牛心臟中分離出來的脂質，CL 存在於微生物、植物與高等動物界中，
大量存在哺乳類動物細胞的粒線體內膜，是粒線體內膜中重要的物質^{24,25}。一般
磷脂質 (Phospholipid, PL) 為生物細胞膜的主要組成，用來保護細胞及區分胞
器，常見的磷脂質為 Phosphatidic acid (PA)、Phosphatidylethanolamine (PE)、
Phosphatidylcholine (PC)、Phosphatidylserine (PS) 和 Phosphatidylinositol (PI)。
心磷脂結構和合成方法與其他磷脂質不同，一般磷脂質的結構為一個甘油骨架
(glycerol backbone) 連接負電價陰離子頭端 (anionic head group)，再由甘油骨
架接上疏水性的醯基鏈 (acyl chains)，形成親水性頭端與疏水性尾端兩種性質的
磷脂質，而心磷脂的結構是由兩個甘油骨架 (glycerol backbone) 連接負電價陰
離子頭端 (anionic head group)，再由甘油骨架接上四條疏水性醯基側鏈 (acyl
chains) 所組成²⁶。真核生物中心磷脂主要是由亞油醯基(C18:2)₄ 組成，在重塑
CL 時具有其獨特性和對稱性²⁷。哺乳動物 CL 種類通常為對稱的 C18:2 的醯基
鏈²⁸。CL 在粒線體中藉由靜電吸引力和疏水作用來穩定蛋白質複合物的結構功
能，並維持細胞膜的完整性。CL 是真核動物細胞中唯一在粒線體中合成的磷脂

質，在能量代謝中參與電子傳遞鏈上游的生物體反應，例如呼吸傳遞鏈上的蛋白質複合體(Electron transport chain complex II, III, IV)及 ATP 合成酶(ATP synthase)，並影響細胞中 ATP 能量轉換^{29,30}。CL 會與 proton 形成不同種類蛋白質結合的 acid anion 結構³¹。CL 與細胞凋亡相關的 ATP 膜蛋白在粒線體中合成，例如氧化 CL 主要通過細胞色素複合酶 (Cytochrome c) 催化機制進行，當粒線體凋亡時會釋放促凋亡因子進入細胞質，造成細胞中心磷脂過氧化產物的積累，使活化細胞中凋亡因子 Caspase3、Caspase9 引發細胞凋亡^{32,33}。與 CL 相關的基因或是蛋白質會和疾病的生成有直接的關連，例如重塑 (Remodeling) CL 的 Taffazzin 蛋白缺陷引發巴氏綜合症，造成擴大型心肌病變、嗜中性白血球減少、骨骼肌肉病變和粒線體異常等症狀^{30,5}。CL 經過心磷脂水解酶 (PLA, phospholipase A) 水解甘油骨架連接的一個醯基鏈，形成三個醯基鏈組成的 MLCL，MLCL 參與 CL 的重塑與凋亡。

在 CL 一系列的合成中，CDP-二酰基甘油合成酶參與 CL 初期的合成步驟，形成未成熟的心磷脂，再經過醯基轉移酶將心磷脂上的飽和醯基鏈轉換成不飽和的醯基鏈，形成具有功能性的成熟心磷脂，後續才能利用生物體內呼吸傳遞鏈複合物I、呼吸傳遞鏈複合物II、呼吸傳遞鏈複合物III、呼吸傳遞鏈複合物IV進行 ATP 能量的合成^{34,35}。



圖一、心磷脂結構圖

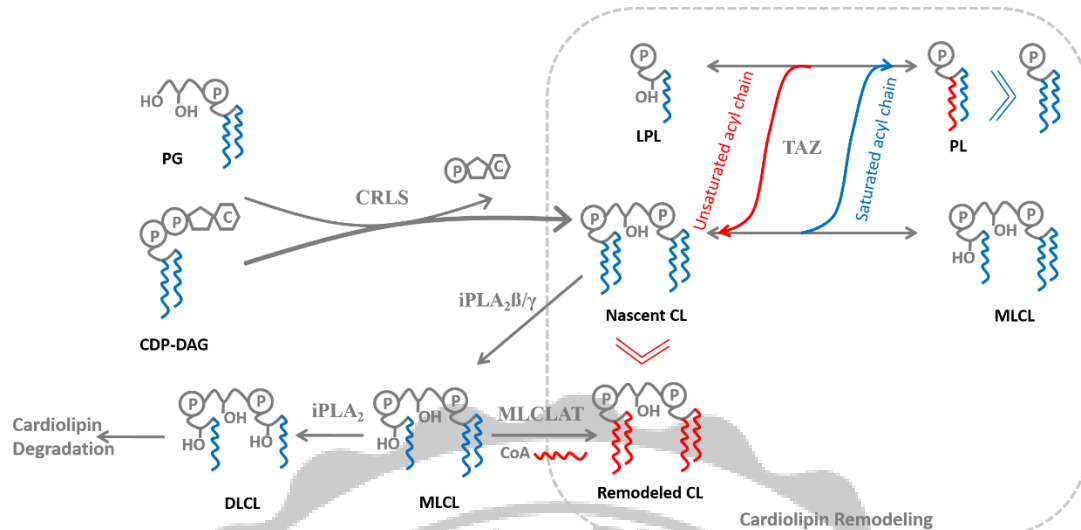
由一個甘油骨架連接兩個磷酸基團 (綠色) 組成親水性的頭端，再連接一個甘油骨架 (黑色) 與疏水性的醯基鏈 (紅色和藍色)，形成巨大的心磷脂結構。

其中醯基鏈的多樣性構成不同種類的心磷脂。

1.5 CL 合成與水解相關路徑

由於生物代謝途徑的演化方向，CL 合成途徑在原核細胞與真核細胞不同³⁶。真核細胞的 CL 合成是從粒線體的外膜開始，glycerol-3-phosphate (G3P) 經由 glycerophosphate acyltransferase 和 acylglycerophosphate acyltransferase 合成 phosphatidic acid (PA)，PA 被脂質轉移蛋白 (Lipid transfer protein) 送到粒線體內膜與三磷酸胞苷 (Cytidine triphosphate, CTP) 合成 cytidine diphosphate-diacylglycerol (CDP-DAG)，phosphatidylglycerol phosphate synthase (PGS) 將 CDP-DAG 與 G3P 合成 PG，CDP-DAG 和 PG 是心磷脂合成的兩個主要原料，透過 CRLS 脫去一個 CMP 後生成 CL³⁷。原核細胞則是將 CDP-DAG 合成 PG 及 PE，由兩個 PG 或是將一個 PG 和一個 PE 合成 CL³⁸。

磷脂質水解酶 (Phospholipase PLA, PLC and PLD) 以催化不同磷脂質水解反應作為分類，當磷脂質被水解時會直接影響細胞膜組成，釋放出各種類脂質的代謝產物，在下游許多生理功能中扮演重要的生物訊號以傳達生理反應之訊息。PLA₂ 以其不同特性區分為 12 至 14 大類型，大致分為分泌型 (Secretory PLA₂, sPLA₂)、胞漿型 (Cytosolic PLA₂, cPLA₂)、鈣離子非依賴型 (Calcium-independent PLA₂, iPLA₂)、脂蛋白結合型 (Lipoprotein-associated PLA₂, Ip-PLA₂) 以及血小板活化因子乙醯水解酶 (Platelet-activating factor acetylhydrolase, PAF-AH)³⁹。iPLA₂ 主要為 iPLA₂β 及 iPLA₂γ 兩種，為非鈣離子依賴型的 PLA₂，存在於細胞的粒線體及內質網中，調控粒線體膜上磷脂質組成⁴⁰。並調節細胞色素 *c* 的釋放控制細胞凋亡與壞死⁴¹。



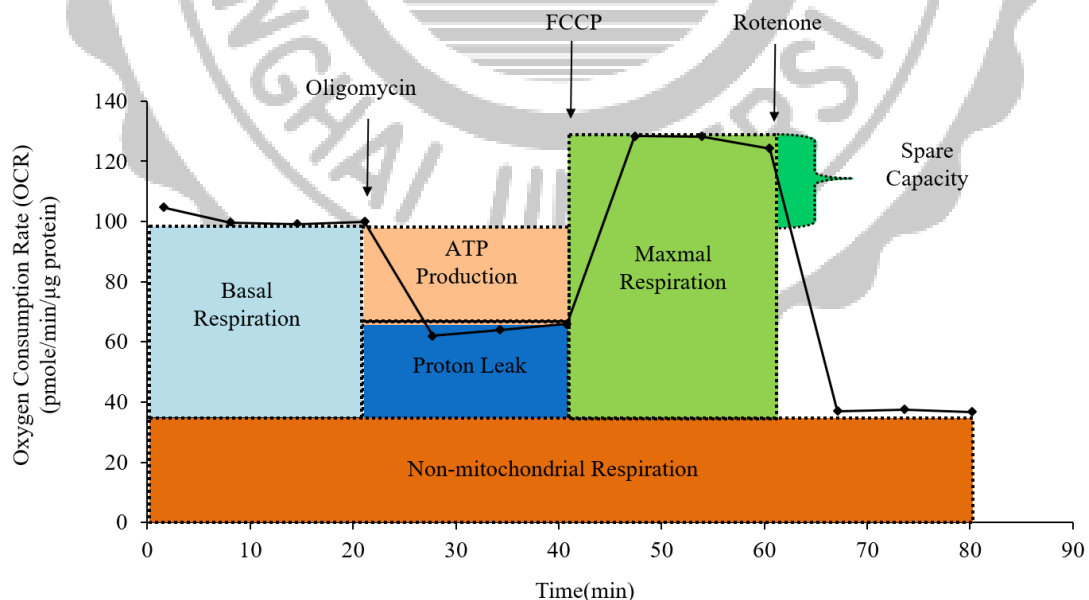
圖二、心磷脂合成與水解路徑圖

PG 與 CDP-DAG 經過心磷脂合成酶的作用合成初始未成熟的心磷脂 (Nascent CL)，再經由醯基轉移酶 TAZ 將 Nascent CL 和 PC 或是 PG 置換成不飽和醯基鏈的心磷脂，不同碳數的醯基鏈組成 Remodeled Cardiolipin，此時重塑後的心磷脂也會經過 iPLA₂ 家族水解醯基鏈，脫去一條醯基鏈變成單水解心磷脂，單水解心磷脂也可以經過單水解心磷脂乙烯基轉移酶 (Monolysocardiolipin acyltransferase, MLCLAT) 或是 Tafazzin 重新接上一條醯基鏈合成心磷脂，或者再被水解成 DLCL 進入代謝分解的途徑⁴²。

1.6 粒線體活性偵測

粒線體主要的功能是透過電子傳遞鏈與 ATP 合成酶提供細胞能量，粒線體內膜上的電子從複合蛋白 I、II、III、IV 依序傳遞，將 H⁺ 從內膜送至膜層間，內膜兩側的電位差驅使 ATP 合成酶合成 ATP，電子最後傳遞至複合蛋白 IV 被 O₂ 接受，消耗 O₂ 產生水提升細胞耗氧量⁴²。若要分析粒線體呼吸作用，則必須以電子傳遞鏈及 ATP 合成的相關抑制劑調控細胞耗氧率。使用的活性偵測為兩種可逆的螢光探針，能即時偵測細胞周圍 O₂ 與 H⁺ 含量，得到細胞中耗氧率 OCR (Oxygen Consumption Rate) 與產酸率 ECAR (Extra Cellular Acidification Rate)

的情況。OCR 值藉由偵測粒線體中電子傳遞鏈的耗氧率，起始偵測細胞粒線體於基礎狀態時消耗氧氣效率，添加第一種藥物 oligomycin 為 ATP 合成酶抑制劑，結合 ATP 合成酶 Fo 質子通道的亞基，阻斷 H⁺回至粒線體內膜並抑制 ATP 的合成⁴³，膜層間 H⁺濃度提升停止複合蛋白 IV 運作，下降的細胞耗氧率即為 ATP 合成耗氧量^{43b}。之後添加第二種藥物 Carbonil cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 為一種解偶聯劑，作為 H⁺載體平衡粒線體內膜兩側的 H⁺濃度，以減少內膜的膜電位，FCCP 提升 H⁺與 Na⁺在內膜的穿透性但不影響 Ca²⁺的電位差，當 H⁺膜穿透提升使電子傳遞鏈於極限狀態下空轉，來評估粒線體最大耗氧量^{44,45,46}。最後添加第三種藥物魚藤酮 (Rotenone) 抑制電子傳遞鏈，抑制呼吸傳遞複合物 I 將粒線體內膜中電子傳送到呼吸傳遞複合物 III，阻斷 NADH 脫氫酶和輔酶 Q 之間的電子傳遞，終止整個電子傳遞機制，完全停止粒線體的耗氧得到細胞耗氧的背景值⁴⁷。添加 3 種藥物得到 4 個階段的耗氧率，耗氧率差異的意義如下圖所示 (圖三)。



圖三、粒線體呼吸耗氧率作用圖

粒線體基礎耗氧率 (Basal respiration) 即為整體耗氧率扣除非粒線體呼吸作

用。當加入 Oligomycin 停止 ATP 合成後，耗氧率下降測得 ATP 合成耗氧率 (ATP production)。粒線體中非合成 ATP 用途的質子滲漏耗氧率 (Proton leak) 為粒線體基礎耗氧扣除 ATP 合成耗氧率。加入 FCCP 的最大耗氧率扣除非粒線體耗氧的呼吸作用極限為最大呼吸作用耗氧率 (Maximal respiration)，作為呼吸作用潛力的指標，最大呼吸作用耗氧扣除基礎呼吸作用耗氧率即為呼吸作用備用耗氧率 (Spare capacity)，添加 Rotenone 以停止粒線體呼吸作用。細胞中電子傳遞鏈產生 ATP 作為能量的來源，產生的 O_2 為電子傳遞中電子的最終接受者，因此可以藉由耗氧率推測粒線體產能的速率，得到非粒線體呼吸作用耗氧率 (Non-mitochondrial respiration)。

1.7 研究動機

各項研究中皆證實缺乏 TAZ 基因的細胞模型中，提供細胞能量來源的粒線體受到損傷，且粒線體內膜的心磷脂組成會產生變化，最終導致生物體死亡。現今的醫療系統中提供基因治療或是給予藥物延緩症狀，然而細胞心磷脂的調控機制作用部分尚未明確，因此我們使用更易表現的單倍染色體細胞模型，觀察細胞粒線體形態差異，並轉染 TAZ 基因和添加合成心磷脂的原料 PG，再藉由基因表達觀察細胞中心磷脂合成與水解的機制調控，期望達到一個治療的效果。我們使用 TAZ 基因剔除的 Hap1 Δ TAZ 細胞作為類似巴氏綜合症患者的初級細胞模型，研究 Tafazzin 缺陷造成細胞粒線體損傷和基因表達的差異，當粒線體功能缺失會導致細胞 CL 組成改變並發現 CL 合成減少，使 CL 含量降低與 MLCL 含量累積而增加。為了觀察細胞粒線體 CL 合成與重塑機制，將 Tafazzin plasmid 進行 transfection 至細胞中，當 Tafazzin 基因送進細胞內，讓細胞轉錄 Tafazzin 的 mRNA，使其 tRNA 轉譯成蛋白質，細胞中製造出 Tafazzin 蛋白質後，再利用質譜儀鑑定粒線體中 CL 的組成，並配合 RT-PCR 偵測細胞中基因表達和細胞轉染 TAZ 基因後，其細胞基因的表達與其他基因間交互作用，期望能在類似 BTHS 的患者細胞

達到進一步的醫治。由於 CDP-DAG 與 PG 為心磷脂合成的原料，細胞缺乏時會導致心磷脂含量降低。因此我們選擇添加 PG(18:1)₂ 到 ΔTAZ 細胞，給予細胞充足的合成 CL 原料，觀察細胞中 CL 組成是否有所改變，並分析 CL 合成與水解機制調節，觀察直接添加和成心磷脂的原料 PG 到細胞中是否影響細胞粒線體 CL 合成，預期在 ΔTAZ 細胞中的 CL 合成能進行回復，且使 MLCL 含量減少降低，達到給予 PG 使細胞心磷脂回復的改善效果。



第二章、材料與方法

2.1 Hap1 和 Δ TAZ 細胞培養

使用細胞株為 Hap1 和 Δ TAZ 人類類纖維細胞，以 90% 1 X DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 購自 Invitrogen, St.Louis MO)、10% FBS (Fetal Bovine Serum, 購自 Invitrogen, St.Louis MO) 及 0.005% pen-Strep (Penicillin-Streptomycin, 購自 Invitrogen, St.Louis MO) 配置細胞培養液，培養於含有 5% CO₂、溫度 37 °C 環境中。使用 1 X PBS (10 X PBS, 購自 Invitrogen, St.Louis MO) + 1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, 購自 Invitrogen, St.Louis MO) 清洗細胞，再用蛋白水解酶 trypsin (購自 Invitrogen, St.Louis MO) 處理三分鐘後，取適量細胞放入新培養盤作為繼代。

2.2 利用 Megabase-scale CRISPR/Cas9 將細胞 TAZ 基因 knockout

使用 Megabase-scale CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) 方法進行細胞 TAZ 基因剔除，首先將細菌的核酸內切酶 Cas9 與一個引導細胞找到目標位置大小 23nt guide 序列和另一個 100 + nt scaffolding part 序列組成的 guide RNA (gRNA)，將 CRISPR-Cas9 的 plasmid 和 gRNA GCAGGACTGGTGA 927TTGGACA934 的 plasmid 轉染到細胞內形成環狀結構為核糖核蛋白複合體，由 gRNA 序列中 5' 端位置前端 20nt 長度序列後面的三個核苷酸序列 PAM (Protospacer adjacent motif) 會引導 Cas9 蛋白辨別宿主細胞中特定 Tafazzin 序列，進行細胞中的基因刪除後，再通過非同源末端連接片段的 DNA 進行修復，以轉譯的方式在細胞中達到基因編輯作用，再經由抗生素篩選後，使用 PCR 做 RNA 測序基因表達 (RNA sequencing)，以全基因組測序 (Whole-genome sequencing) 來確定細胞中突變 Tafazzin 基因 (表一)，培養出 knockout 的細胞株作為本實驗所使用之初代細胞模型 (委託 Horizon Discovery, UK)。

表一、HAP1 Δ TAZ 細胞 Knockout Tafazzin gRNA 序列。

179 CACGCCCTCATCACCGTGtCCAATCACCAGTCCTGCATGGA 221
CACg CCCCTCATCACCGTGt - - AAtCACCAGTCCTGC a TGGA
Ala Thr Pro Leu Ile Thr Val***

2.3 Hap1 和 Δ TAZ 蛋白質定量

以 Bradford protein-binding assay 的方法進行蛋白質定量，此定量方法利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (購自 BIO-RAD, Hercules CA) 與 G-250 蛋白質結合的特性。使用 1 mL 1 X PBS 均勻沖散以清洗細胞此兩次，取 100 μ l (1/10 盤細胞) 至 eppendorf 中，離心 3000 rpm 5 分鐘，去除上清液留細胞 pellet，配置 0.1% Triton (購自 OmniPur, Germany)，加入 100 μ L 0.1% Triton 至 eppendorf，pipette 混和均勻後再放入水浴槽震盪 5 分鐘以破細胞，離心 10000 rpm 2 分鐘將細胞殘渣離心，取上清液進行蛋白質定量。配置 Coomassie Brilliant Blue : DDW (1 : 4) 和 BSA (250 ng/mL) 作定量標準曲線，並使用微盤分析儀 (SpectraMax M Series Multi-Mode Microplate Readers) 在 595 nm 波長下進行偵測。

2.4 抽提 mRNA

加入 TAZ plasmid 的細胞置於細胞培養箱培養 48 小時後，將細胞置於冰上吸除培養基，加入 500 μ L PBS 清洗細胞並吸除，再加入 1 mL TRIzol (購自 invitrogen, St.Louis MO) 將細胞刮起來吸取至 Eppendorf 中，接著在室溫靜置 5 分鐘，加入氯仿 (Chloroform) 搖晃出現粉紅色分層，並於 4 $^{\circ}$ C 低溫離心 (12000 rpm, 15 分鐘)，取上清液到新的 Eppendorf，再加入 500 μ L 異丙醇 (Isopropanol) 輕輕搖晃。於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱靜置 20 分鐘後，室溫靜置 10 分鐘，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 (12000 rpm, 15 分鐘)，去除上清液只留下 pellet，加入 75% 乙醇 (EtOH)，4 $^{\circ}$ C 低溫離心 (9000 rpm, 5 分鐘) 再去除上清液，加入 20 μ L DEPC 水，將 pellet 沖散，放置 50 $^{\circ}$ C 水浴 5 分鐘，室溫靜置 5 分鐘後，得到的 RNA 於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.5 mRNA 轉 cDNA

使用 iScript cDNA Synthesis Kit (購自 BIO-RAD, Hercules CA)。抽提出的 mRNA 依序加入 DEPC 水 (Nuclease-free water 購自 invitrogen, St.Louis MO)、RNA template(1 μ g total RNA)、4 μ L 5X iScript reaction mix 和 1 μ L iScript reverse transcriptase, 配製總體積為 20 μ L, 置於室溫 5 分鐘。在水浴溫度設定為 42 $^{\circ}$ C 恆溫 30 分鐘, 再放置水浴 85 $^{\circ}$ C 下恆溫 5 分鐘, 於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存 cDNA。

2.6 Real-time quantitative PCR

RT-PCR 使用「探針型」SYBR Green system Super Mix (購自 BIO-RAD, Hercules CA), DNA 模板 (ZGene Biotech Inc., 購自台灣), 儀器條件設定為 95 $^{\circ}$ C 3 分鐘使 DNA 模板雙股打開, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, T_m 60 $^{\circ}$ C 30 秒使 primer 黏上後, 開始依序進行 40 cycles 循環, 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 為 Melting Curve。

2.7 粒線體活性測定

錐形瓶裝取 100 ml 已滅菌之去離子二次水, 加入 DMEM 粉末 1.35 克, 攪拌至完全溶解, 加入 2% 血清, 以 1N HCl 及 1N NaOH 將培養液 pH 值調至 7.4, 以 0.2 μ m filter 過濾培養液至血清瓶中, 再分裝至 50 mL 離心管於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。將細胞至於 96 well 孔盤, 在將探針浸泡標準液放置培養箱含有 5% CO₂, 溫度 37 $^{\circ}$ C 環境中隔夜, 上機前先將探針進行校正後, 將細胞放入海馬能量測定儀 (Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer, 購自 Seahorse Bioscience, Billerica MA), 之後設定的條件於細胞孔盤上的孔洞分別加入偵測的藥物為 1 μ M FCCP (Carbonilcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone, 購自 Agilent, Santa Clara, CA 95051, United States)、1 μ M Oligomycin 和 1 μ M Rotenone (購自 Agilent, Santa Clara, CA 95051, United States), 最後使用蛋白質定量以校正細胞數。

2.8 使用 Tafazzin plasmid 轉染 Hap1 Δ TAZ 細胞

取約 3×10^6 顆 Hap1 細胞培養於含有 4 mL 培養液的 60 mm 細胞盤中，等待 1 小時細胞半貼覆盤面。加入 RocheX-teremGENE HP DNA Transfection Reagent (購自 Roche Applied Science, Germany) 與 5 μ g Tafazzin DNA (體積比 2:1)，於 37 °C、5% CO₂ 細胞培養箱培養 48 小時後，將細胞收起。

2.9 西方墨點法 Western blot

使用 Δ TAZ 細胞加入 HP kit 與 TAZ plasmid 體積比 1:2 經過 transfection 48 小時培養後，加入 200 μ L RIPA buffer 破細胞，並取 500 μ g 蛋白質與 5 X sample buffer(4:1)，Marker 使用 Prestain Protein Marker Part No. 00050917 (購自 BioKit, S.A.)，進行 SDS 實驗。上下膠電壓 90 V 跑電泳 2 小時，一級抗體使用 anti-DDK (購自 Novus Biologicals, USA) 1:2000，於 4 °C 下搖晃 16 小時，再使用二級抗體 Mouse (IgG, 購自 BIO-RAD, Hercules CA) 1:2500 於室溫搖晃 90 分鐘。

2.10 使用 TEM 觀察 Hap1 和 Δ TAZ 細胞

先以 1X PBS 將蓋玻片固定於 35 mm 細胞盤放置 UV 下 24 小時。將細胞分盤至 35 mm 細胞盤，細胞密度控制約 4×10^5 顆細胞，培養在含有 5% CO₂，溫度 37 °C 環境中 24 小時。將玻片放入 2.5% 戊二醛浸泡 1.5 小時以固定細胞樣品，用 PBS (pH7.0) 清洗兩次，添加 1% Osmium tetroxide 浸泡 1 小時做二次固定，經遞增濃度的酒精將樣品脫水，使用斯珀爾樹脂 (Spurr resin) 於 72 °C 下聚合 12 小時進行樹脂包埋後，用 Leica UC7 超薄切片處理程序再以銅網蒐集樣品，於 100 kV 加速電壓的 Hitachi HT-7700 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 下，觀察細胞粒線體形狀。

2.11 Hap1 Δ TAZ 多次添加 PG(18:1)₂

配置 25 mg/ml DOPG(Phosphatidylglycerol, 18:1/18:1 購自 Avanti Polar Lipids Alabaster, AL) 1 ml 溶於乙醇。取約 3×10^5 顆 Hap1 細胞培養於含有 4 ml 培養液的 60 mm 細胞盤中，分別以 0 小時與 24 小時添加兩次 50 μ M 的 PG(18:1)₂，置入 37 °C 恆溫培養箱培育 48 小時後，收取細胞進行 Bligh Dyer 脂質萃取。

2.12 脂質萃取 Bligh Dyer⁴⁸

利用二氯甲烷 CH₂Cl₂：甲醇 Methanol (1:1) 比例進行分層，下層有機層即為全脂質樣品。收細胞後加入 1 ml 1 X PBS 沖散細胞，離心 (3000 rpm, 2 分鐘) 去除上清液，取 2 ml 甲醇至細胞樣品內混合均勻後取至玻璃試管內、加入 2 ml 二氯甲烷，加入 5 μ l 的心磷脂標準品 (CL14:0, 25 μ g/mL)，冰水浴中 sonication 破細胞並離心 (3000 rpm, 5 分鐘)，用玻璃滴管吸取下層到小樣品瓶中，用氮氣將小樣品瓶內溶液吹至快乾。並加入 400 μ L 回溶液 (Acetonitrile/2-propanol/H₂O = 65:30:5) 回溶後，使用 LC-MS 分析樣品。

2.13 固相萃取 SPE

使用 3 ml DDW:MeOH (1:1) 潤洗管柱，將經由 Bligh Dyer 萃取過的總脂質生物樣品以 200 μ L 的 MeOH 回溶並通過管柱，再以 2 mL MeOH:IPA 洗脫管柱至樣品瓶，用氮氣將 MeOH 吹乾，加入 400 μ L 的 IPA 回溶後，使用 LC-MS 分析樣品。

2.14 脂質樣品分析

樣品經 HPLC—ESI—Ion trap MS (High Performance Liquid Chromatography ; Electrospray Ionization-Mass spectrometry) 進行脂質分析。HPLC 移動相系統：移動相 A 分別為 ACN : H₂O (60 : 40)、10 mM ammonium formate 和 0.1% formic

acid, 移動相 B 為 IPA:ACN(90:10)、10 mM ammonium formate 和 0.1% formic acid。移動相梯度:0—25 分鐘為 60% A 與 40% B 到 0% A 與 100% B, 並保持 100% B 到 40 分鐘後, 在 5 分鐘內反至 60% A 與 40% B, 並保持 60% A 與 40% B 至 60 分鐘。使用分離管柱為 Acclaim RSLC 120 C18 2.1 mm x 100 mm 2.2 μ m column(購自 Thermo, USA), HPLC 分析流速為 0.2 mL/min、管柱溫度為 55 $^{\circ}$ C。資料處理均使用 Bruker DataAnalysis (ver.4.3) 軟體取質量訊號之 EIC (Extracted ion chromatogram) 面積來做半定量分析。

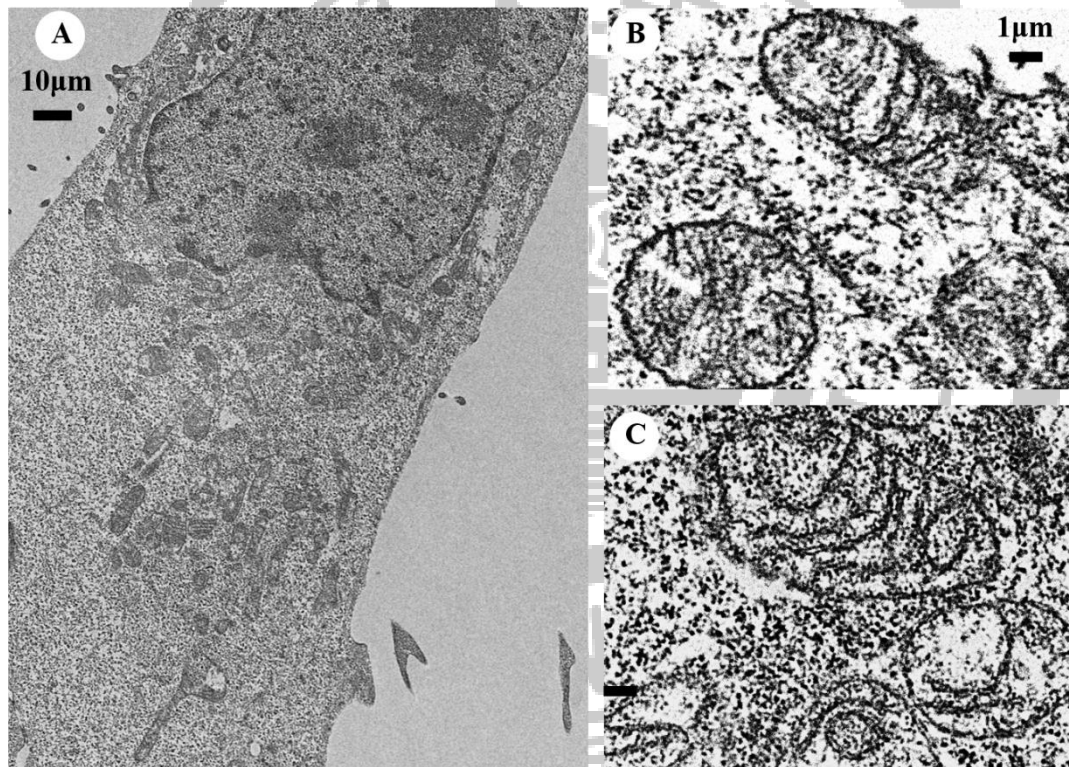
表二、質譜儀參數設定

ESI 設定參數	
Charge mode	Negative mode
Nebulizer	25 Psi
Dry gas	8 L/min
Dry temp.	325 $^{\circ}$ C
Mass range	1000-1600 m/z

第三章、 結果

3.1 TEM 電子顯微鏡

Hap1 細胞經過脫水處理與樹脂包埋後切片製成銅網，使用 Hitachi HT-7700 透射電子顯微鏡觀察之電子顯微鏡圖（圖四）。觀察 Hap1 細胞整顆細胞與細胞核，以及散佈在細胞核周圍的粒線體（圖四 A）。將粒線體放大 10000 倍之電子顯微鏡圖中可以觀察到細胞中完整的橢圓形狀的粒線體，且粒線體內膜皺褶為平滑的形狀，此為 Hap1 細胞粒線體形狀（圖四 B、圖四 C）。

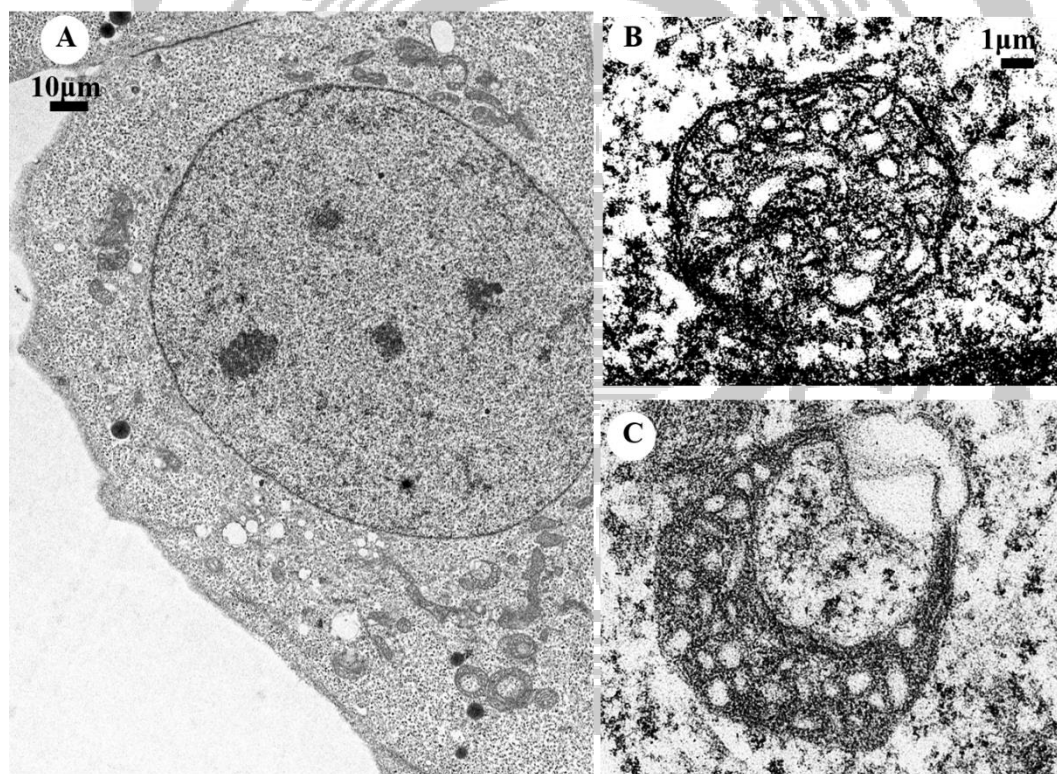


圖四、電子顯微鏡觀察 Hap1 細胞切片圖

圖 A 為經過樹脂包埋後，切片染色製成銅網使用電子顯微鏡觀察 1000 倍之全細胞切片圖。圖 B 和圖 C 為經過樹脂包埋後，切片染色製成銅網使用電子顯微鏡觀察放大 10000 倍之粒線體切片圖。

Hap1 Δ TAZ 細胞經過脫水處理與樹脂包埋後超薄切片做成銅網，使用 Hitachi HT-7700 透射電子顯微鏡拍照之電子顯微鏡圖（圖五）。觀察 Hap1 Δ TAZ 細胞整顆細胞形狀與細胞核，可以觀察到散佈於細胞中的粒線體（圖五 A）。以及將粒線體放大 10000 倍電子顯微鏡圖，發現粒線體在細胞中密度較高且聚集在細胞核周圍，而在細胞中部分的粒線體形狀產生變化，粒線體內膜皺褶為不平整的形狀且產生類似氣泡的內膜在一起堆積（圖五 B 和圖五 C）。

推測 TAZ 基因被剔除時無法進行醯基轉移酶的功能以重塑心磷脂，造成細胞的粒線體內膜產生改變，使細胞粒線體功能產生變異，此為 Hap1 Δ TAZ 細胞粒線體形狀。



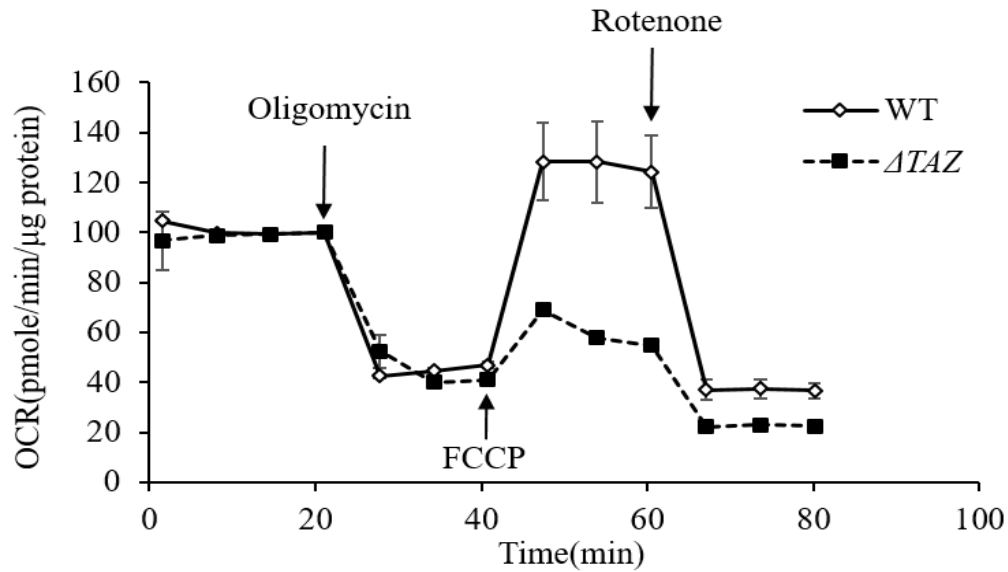
圖五、電子顯微鏡觀察 Hap1 Δ TAZ 細胞切片圖

圖 A 為經過樹脂包埋後，切片染色製成銅網使用電子顯微鏡觀察 1000 倍之全細胞切片圖，圖 B 和圖 C 為經過樹脂包埋後，切片染色製成銅網使用電子顯微鏡觀察放大 10000 倍之粒線體切片圖。

3.2 海馬能量測定儀

使用海馬能量測定儀檢測 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞耗氧率 (pmole/min)，細胞數除以蛋白質定量作定量標準化得到細胞耗氧率 (圖六)。將 Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞放置無 CO₂ 環境的培養基測得細胞基礎呼吸耗氧率，並將標準化數值為 100 pmole/min/ μ g protein，添加 Oligomycin 抑制電子傳遞鏈中 F₁F₀ 合成 ATP 路徑後，造成細胞呼吸傳遞率降低，Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞 OCR 值皆下降到 40 pmole/min/ μ g protein。添加 FCCP 讓粒線體進行空轉以達到最大極限運作，此時 Hap1 細胞 OCR 值上升到 120 pmole/min/ μ g protein， ΔTAZ 細胞 OCR 值則上升到 60 pmole/min/ μ g protein。最後加入的 rotenone 會抑制電子傳遞鏈 I 到電子傳遞鏈 III 作用，關閉細胞呼吸作用使 OCR 值降到最低，Hap1 細胞 OCR 值下降到 40 pmole/min/ μ g protein， ΔTAZ 細胞 OCR 值下降到 20 pmole/min/ μ g protein。

比較 Tafazzin knockout 後造成細胞的粒線體活性變化，在基礎呼吸代謝時 OCR 皆為 100 pmole/min/ μ g protein，當 Hap1 細胞添加 FCCP 時達到最大運作極限，而 ΔTAZ 細胞粒線體電子傳遞鏈作用比基礎呼吸率低，可能是因為 ΔTAZ 細胞粒線體功能損傷或是添加的藥物 FCCP 對 ΔTAZ 細胞粒線體進行二次傷害，造成細胞粒線體的空轉極限效率比基礎呼吸代謝還低。得知 Hap1 細胞添加 FCCP 後 OCR 值增加一倍，且對粒線體進行刺激後的測試中推測 ΔTAZ 細胞因粒線體內膜形狀的改變，影響細胞運作極限。



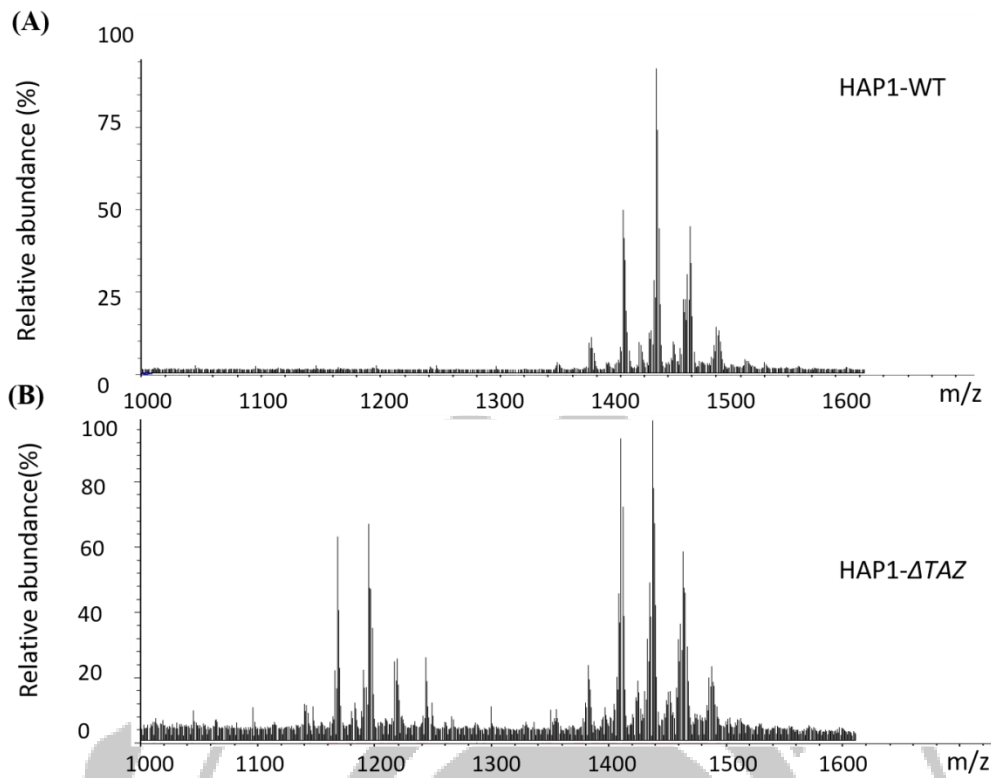
圖六、Hap1 和 ΔTAZ 細胞粒線體耗氧率圖

即時偵測耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)在時間點，20 分鐘加入 oligomycin，40 分鐘加入 FCCP，60 分鐘加入 rotenone 後，Hap1 細胞（黑線）與 ΔTAZ 細胞（虛線）連續偵測 13 個時間點的折線圖。

3.3 Hap1 和 ΔTAZ 細胞 CL 之 LCMS 圖

細胞經過 Bligh Dyer 全脂質萃取後使用高效能逆相層析儀質譜分析。(圖 A) Hap1 細胞中 CL 分成主要五簇 CL 佔細胞總 CL 總含量 100 %。(圖 B) ΔTAZ 細胞中 CL 降低而 MLCL 增加，CL 佔細胞 CL 總含量 50 %， ΔTAZ 細胞 CL 組成比例不同，而 MLCL 含量在細胞中增加一倍。

當 *TAZ* 基因剔除時心磷脂無法進行重塑的功能，在合成 CL 後會走向水解 CL 的路徑，經由水解蛋白將 CL 水解成 MLCL，因此可以藉由質譜圖觀察在 ΔTAZ 細胞中 MLCL 的含量上升而 CL 的含量降低。



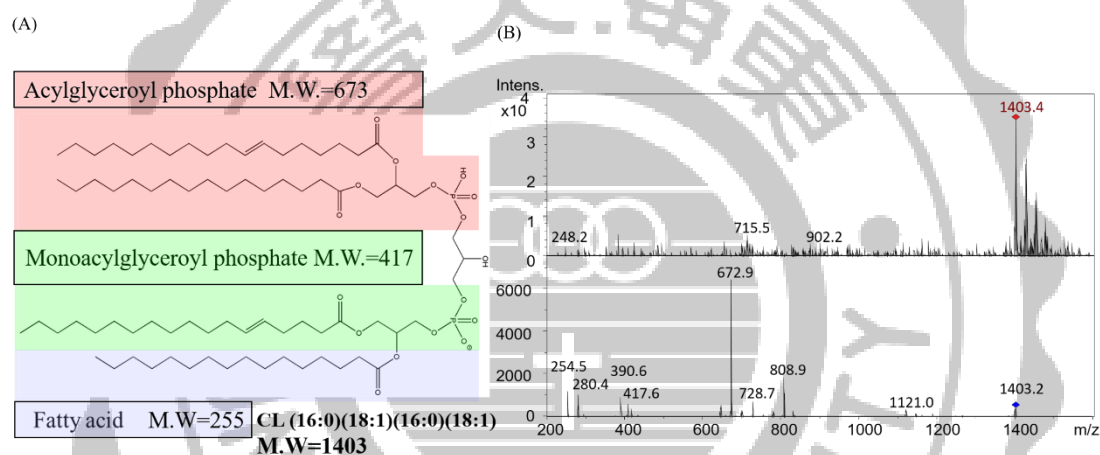
圖七、Hap1 和 Δ TAZ 細胞相對 CL 與 MLCL 質譜圖

圖 A 為 Hap1 細胞經過 Bligh Dyer 方式萃取細胞 CL，經過 LC MS 分析後細胞 MS 圖，圖 B 為 Δ TAZ 細胞經過 Bligh Dyer 方式萃取細胞 CL，經過 LC MS 後的細胞 MS 圖。

3.3.1 心磷脂鑑定

有鑑於 CL 其獨特的結構與電價，細胞經過 Bligh-Dyer 全脂質萃取後經由高效能逆相層析儀質譜分析（圖八）。於 TIC（Total ion chromatogram）圖譜中看到心磷脂標準品（C14:0）於 30 分鐘被沖提出來，其分子量為 1239 m/z ，以此為基準點，分析樣品中 CL 的沖提時間約為 33 分鐘到 39 分鐘，且 CL 在質譜儀中以負電價模式偵測，大部分的 CL 分佈在 1200-1600 Da。其中，心磷脂上的脂肪酸鏈（Fatty acyl chains）的碳數不盡相同，因此在質譜圖中分析區段分成五個群落，這五個群落包含不同的雙鍵數（Double bond）的 CL。使用高效能液相層析儀偵

測多種類的 CL，由於分子量的訊息不足夠辨別 CL 上的脂肪鏈結構與組成，因此進一步使用串聯式質譜 (MS/MS) 子離子模式，分析細胞中各種 CL 的組成與結構。在串聯式質譜儀中心磷脂結構會有較容易被裂解的區域，以 1403 m/z 為例 (圖八 B)，心磷脂在經過裂解後出現 254 m/z 、280 m/z 、417 m/z 和 673 m/z 等訊號，又 16:0 的脂肪酸鏈分子量為 255 m/z ，連接一個甘油骨架與磷酸根的 18:1 脂肪酸鏈分子量為 417 m/z ，而分子量 673 m/z 則是由一個 18:1 和一個 16:0 的脂肪酸鏈與一個甘油骨架和磷酸根所組成 (圖八 A)，藉由此方法辨別分析細胞中心磷脂的組成。



圖八、質譜鑑定 CL 組成圖

(圖八 A) 16:0 的脂肪酸鏈分子量為 255 m/z ，連接一個甘油骨架與磷酸根的 18:1 脂肪酸鏈分子量為 417 m/z ，而分子量 699 m/z 則是由一個 18:1 和一個 16:0 的脂肪酸鏈與一個甘油骨架和磷酸根所組成。(圖八 B) 為 1454 m/z 質譜圖，CL 在經過裂解後出現 254 m/z 、280 m/z 、416 m/z 和 699 m/z 等訊號。

3.3.2 Cardiolipin 定量分析

Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞經過脂質萃取後使用逆向層析分離與串聯質譜結構鑑定，得到的 CL 種類如 (表三) 所列，以 1447 m/z 為例，C72:8 表示 CL 的四條醯基鏈碳數總和為 72 雙鍵數總和為 8，MS2 鑑定種類至少有 (18:2)(18:2)/

(18:2)(18:2)^{1*}及(16:1)(18:1)/ (16:1)(18:0)^{2*}和(16:1)(16:0)/ (18:1)(18:1)²三種，1 為 Hap1 細胞 CL 組成，2 為 Δ TAZ 細胞組成，若標記“*”號表示為最主要的組成種類。在逆相層析滯留時間 33-39 分鐘的質譜圖中初步篩選出分子量與計算值相同的 30 個目標，並以 MS2 鑑定出 25 種不同種類的 CL，Hap1 細胞主要的 CL 種類為 CL68、CL70 和 CL72，其中 C70:4 含量最多。 Δ TAZ 細胞主要的 CL 種類為 CL68 與 CL70，其中 C70:3 含量最多。整體 CL 的醯基鏈長度大多以 Acyl16、Acyl18 為主，Acyl16 的雙鍵數介於 0-1，Acyl18 的雙鍵數介於 1-2，相對不飽和的(18:3)與(20:3)較少出現，尚未鑑定出多不飽和的醯基鏈。



表三、HAP1 & Δ TAZ 細胞中的 CL 種類

Species	m/z	Formula	Species	m/z	Formula
C56:0	1239.5	(14:0)(14:0)(14:0)(14:0)	C72:8	1447.6	(18:2)(18:2)(18:2)(18:2) ^{1*}
C64:3	1345.5	(16:2)(14:0)(16:1)(18:0)			(16:1)(18:1)(16:1)(18:0) ^{2*}
C64:2	1346.7	(16:1)(14:0)(16:1)(18:0)			(16:1)(16:0)(18:1)(18:1) ²
C68:8	1392.2	(16:1)(16:1)(36:5) ^a	C72:7	1449.6	(18:2)(18:2)(18:2)(18:1)
C68:7	1393.4	(16:1)(16:1)(18:2)(18:3) ¹	C72:6	1451.6	(18:2)(18:2)(18:1)(18:1)
		(16:1)(16:1)(16:1)(20:4) ²	C72:5	1453.6	(18:2)(18:1)(18:1)(18:1)
C68:5	1397.6	(16:1)(16:2)(18:1)(18:1) ¹	C72:4	1455.6	(18:1)(18:1)(18:1)(18:1)
		(16:1)(16:1)(18:2)(18:1)	C72:3	1456.7	(18:1)(18:1)(16:1)(20:0) ²
C68:4	1399.6	(16:1)(16:1)(18:1)(18:1) ¹	C74:8	1475.6	(18:1)(20:3)(18:2)(18:2)
C68:3	1401.6	(16:1)(18:1)(16:1)(18:0)	C74:7	1477.6	(18:1)(20:3)(18:1)(18:2)
		(16:1)(16:0)(18:1)(18:1)	C74:6	1479.7	(18:1)(18:1)(18:1)(20:3)
C68:2	1403.6	(16:0)(18:1)(16:0)(18:1) ²	C74:10	1473.1	(18:1)(18:1)(16:1)(22:6) ²
C70:6	1423.6	(18:1)(18:1)(16:0)(18:4) ²	C74:9	1474.0	(18:1)(18:3)(18:0)(20:5) ²
C70:5	1425.6	(18:1)(18:1)(16:1)(18:2) ¹	*:main species a:predicted formula 1:HAP1 Cell only 2: Δ TAZ Cell only		
		(18:1)(18:1)(16:0)(18:3) ²			
C70:4	1428.4	(16:1)(18:1)(18:1)(18:1)			
C70:3	1429.6	(16:1)(18:0)(18:1)(18:1) ¹			
		(16:0)(18:1)(18:1)(18:1) ²			
C70:2	1431.3	(16:0)(18:1)(18:1)(18:0) ²			

表四、 ΔTAZ 細胞中的 MLCL 種類

Species	m/z	Formula	Species	m/z	Formula
C50:5	1132.2	(18:0)/(32:5) ^a	C56:7	1212.5	(18:1)(18:1)/(20:5) [*]
		(24:0)/(26:5) ^{a*}			(18:0)/(38:7) ^a
C50:3	1136.4	(16:1)(18:1)/(16:1)	C56:6	1213.5	(18:1)(18:1)/(20:4) [*]
		(18:1)(18:1)/(14:1) [*]			(22:4)/(34:2) ^a
C50:2	1137.5	(16:0)(16:1)/(18:1) [*]	C56:6	1214.4	(20:2)(18:1)/(18:3) [*]
		(16:0)(16:0)/(18:2)			(18:1)(18:1)/(20:4)
		(18:1)(18:1)/(14:0)			(18:0)/(38:6) ^a
C52:4	1163.5	(16:0)(18:1)/(18:3)	C56:5	1215.5	(18:2)/(38:2) ^a
C52:3	1164.2	(16:1)(18:1)/(18:1)			(18:1)/(38:3) ^{a*}
C52:2	1165.5	(16:0)(18:0)/(18:2)	C56:4	1217.4	(18:0)(18:0)/(20:4) [*]
C52:1	1166.3	(16:0)(18:1)/(18:0)			(18:2)/(38:2) ^a
C53:4	1175.7	(18:0)/(34:4) ^a			(20:0)/(36:4) ^a
C53:3	1177.5	(17:1)/(36:2) ^{a*}	C58:5	1238.4	(18:1)/(40:4) ^a
		(18:1)/(35:2) ^a			*:main species
C54:6	1186.4	(16:0)(20:3)/(18:3) [*]	a:predicted formula		
		(18:1)(22:5)/(14:0)			
C54:5	1187.4	(18:1)(20:0)/(16:4)			
		(16:0)/(38:5) ^{a*}			
C54:4	1189.5	(16:0)(18:1)/(20:3)			
C54:3	1191.5	(18:1)(18:1)/(18:1) [*]			
		(16:0)(20:3)/(18:0)			
		(17:0)/(37:3) ^a			
C54:2	1194.4	(18:1)(18:0)/(18:1)			

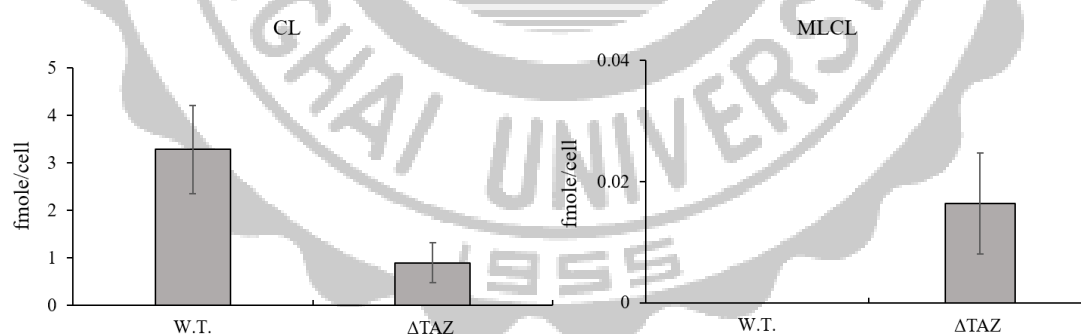
3.3.3 Hap1 和 ΔTAZ 細胞 CL 與 MLCL 總量

計算各組實驗處理的 CL 與 MLCL 總量 (圖九)，細胞中 CL 和 MLCL 的半定量計算公式如下：

每個細胞的 CL(MLCL)總含量(fmole)=

$$\frac{\text{所有 CL(MLCL)的 EIC 積分面積加總}}{\text{內標準品 EIC 積分面積}} \times \text{內標準品含量} \div \text{細胞數} (\text{fmole})$$

Hap1 細胞平均每個細胞中經過鑑定的 CL 總量約為 3.28 fmole，每個細胞中鑑定的 MLCL 總量約為 0 fmole。 ΔTAZ 細胞中 CL 的總量為 0.90 fmole，MLCL 的總量上升為 0.016 fmole，CL/MLCL 的比值為 56.5 倍。 ΔTAZ 細胞中 CL 總量降低，MLCL 的含量增加，推測 Tafazzin 蛋白對細胞本身的心磷脂醯基鏈重塑造造成 CL 不同的組成，之後進行 transfection Tafazzin 觀察細胞 CL 變化。



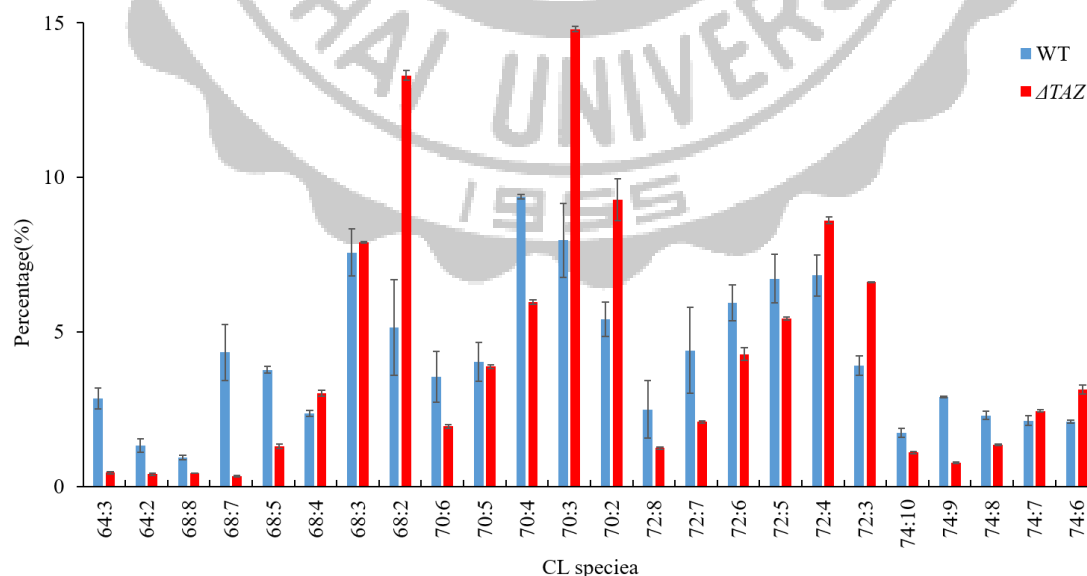
圖九、Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞中 CL 與 MLCL 總量圖

Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞培養 24 小時後，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量，單顆細胞中 CL 與 MLCL 總量圖。

3.3.4 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞 CL 組成之影響

Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞經過脂質萃取後使用逆相層析分離與串聯質譜儀，分析細胞中 CL 和 MLCL 組成與差異。Hap1 細胞中 CL(70:4)CL(72:5)CL(72:6)和 CL(72:7)高雙鍵數的 CL 含量比 ΔTAZ 細胞多，中碳鏈 CL(70:4)CL(68:3)和 CL(68:7)隨雙鍵數增加也有相同的表現，其中 CL(70:4)占最高比例，其組成為 CL(16:1)(18:1)/(18:1)(18:1)，次高比例的 CL(68:3)為 CL(16:1)(18:1)/(16:1)(18:0)，整體 CL 組成的醯基鏈以 Acyl16、Acyl18 為主，Acyl18 的含量略多於 Acyl16。 ΔTAZ 細胞中 CL(68:2)、CL(70:3)、CL(70:2)、CL(72:4)和 CL(72:3)等多個種類的心磷脂明顯增加，推測 ΔTAZ 細胞中的 CL 組成偏向 Acyl16。在 ΔTAZ 細胞的 CL 種類中，CL(70:2)的組成 CL(16:0)(18:1)/(18:1)(18:0)中有 2 個對稱於不同側的 Acyl(18:1)，次高的 CL 組成 (16:0)(18:1)/(16:0)(18:1)的 CL(68:2)最多，Acyl18 含量略多於 Acyl16。

經由質譜觀察 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中 CL 組成醯基鏈改變，發現 ΔTAZ 細胞中 CL 醯基鏈的飽和度增加，推測缺乏 TAZ 時無法將 CL 飽和醯基鏈置換成不飽和的醯基鏈。



圖十、Hap1 W.T.細胞和 ΔTAZ 細胞 24 種 CL 的組成比率圖。

Hapl 細胞和 ΔTAZ 細胞培養 24hr 後，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，所得總細胞 CL 種類含量圖。

3.4 RT-PCR

利用 RT-PCR 分析 Hap1W.T.細胞與 ΔTAZ 細胞中相關的基因 mRNA 表現量，實驗所選擇的 mRNA 與 CL 合成、重塑、水解、能量代謝以及細胞凋亡和細胞發炎反應相關，引子設計如 (表五)。

表五、Real-time quantitative PCR 引子設計

GeneID	AccessionNumber	ForwardOligoSequence 5'-3'	ReverseOligoSequence 5'-3'	ProductSize (bp)	Temp (°C)	IntronSpanning
<i>CDS1</i>	NM_001263	CACCAGCGACAAAGAAAC	AGGATGGTGGAAATTCCG	89	73.9	yes
<i>PGS1</i>	NM_024419	GAACAGGAGCTGGTGGAC	CTAAGAGAATGGAGACCTTGAGAT	91	76	yes
<i>CRLS1</i>	NM_001127458	AGCAGTCCAGTTAATCTT	TTATCACCTGAACAGTCTT	161	78	yes
<i>LCLAT1</i>	NM_001002257	TGCTTGTCACAGAATCAT	CCAATAATGCCACAGGTA	191	79.2	yes
<i>TAZ</i>	NM_000116	AAGGGAAAGTGAACATGA	AGATGACACTCAGCAATC	76	76.5	yes
<i>FADS2</i>	NM_001281501	TTTGTTTGTGTGTGCGTGT	GCGGAAGGCATCCTGTG	76	79.2	yes
<i>PLA2G6</i>	NM_001004426	GACCGAGATCCATGAGTA	ACAACGATGGAGAGTTTC	78	78	yes
<i>PNPLA8</i>	NM_015723.4	GGGTGAGTATTGATAACAG	GAATAATCTTTCCTTGACAG	152	—	yes
<i>PLD3</i>	NM_012268	TGATGTACCAGGAGCTGAAG	TTCCACGCCTCAATCTCA	76	79.2	yes
<i>ATP5A1</i>	NM_001001935	AACTGATTATTGGTGACCGACAG	GGCAACAGTGGATCTCTTTTGA	149	62.1	yes
<i>SDHA</i>	NM_001294332	TGTTGCAGCACAGCTAGAA	CATATCGCAGAGACCTTCCA	191	—	yes
<i>CYCS</i>	NM_018947	TTCAACACCTCTCACATCTTACAG	GCACCATTCCCAATCAAATACAC	180	74.4	yes
<i>BID</i>	NM_001196	AATAGAGGCAGATTCTGAAAGTCA	GCTACGGTCCATGCTGTC	88	79.1	yes
<i>PLSCR3</i>	NM_001201576	AATTCCTGGTGCAGATTGAT	CGCAGTTCATACCGATTACA	97	77.8	yes
<i>PTGS1</i>	NM_000962	CCTTGACCGCTACCAGTGTGA	GTCCACAGGCCAGGGATGG	75	82.7	yes
<i>PTGS2</i>	NM_000963.3	TAAGTGCATTTGATACCCGGAC	TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT	250	—	yes
<i>ALOX5</i>	NM_000698	CTGTTTCATCAACCGCTTCA	GACCCGCTCAGAAATAGTG	105	76.8	yes
<i>GAPDH</i>	NM_001289745	CACCGTCAAGGCTGAGAAC	GAGGGATCTCGCTCTGG	75	77.8	yes

Ct 值 (Threshold cycle) 是指 PCR 反應樣本擴增之生成量能夠通過閾值 (Threshold) 之相對應 cycle number, 分析軟體 auto Ct 以 3-15 cycles 的螢光訊號標準差 10 倍作為閾值, Ct 值越小起始複製數越多。將目標 mRNA 相對定量需要三個數值, 基準點 (Calibrator)、實驗點及內部校正點 (Internal control)。實驗控制組為基準點, 參考基因 (Reference gene) 為內部校正點, 以 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 為參考基因, 計算公式:

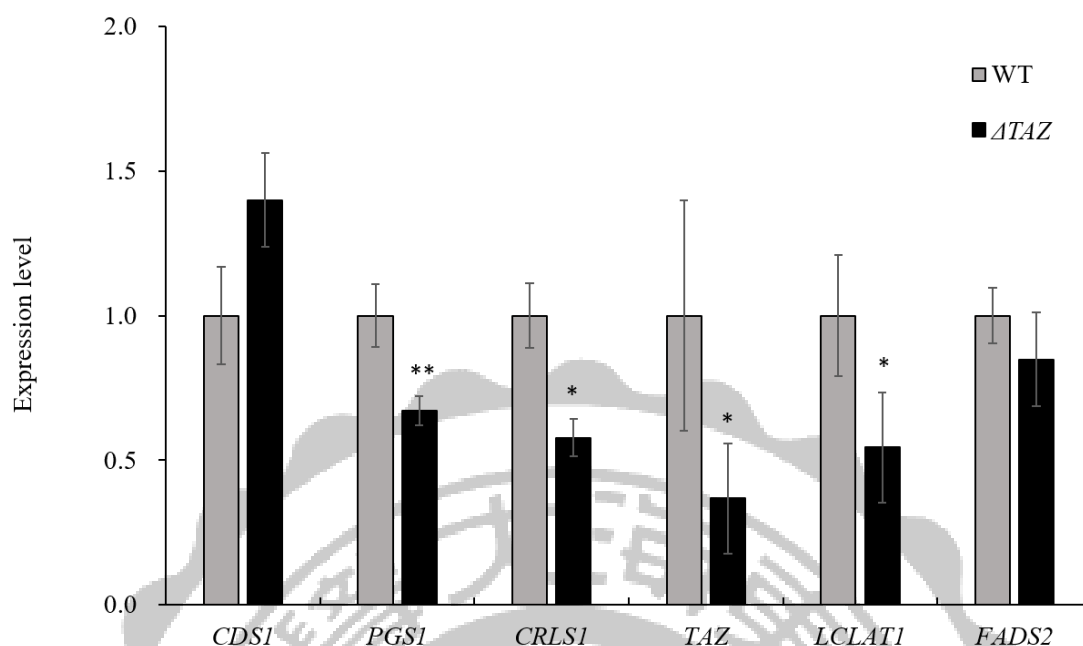
$$\Delta Ct = \text{目標基因 Ct} - \text{參考基因 Ct}$$

實驗點與基準點之間的相對倍率為 $2^{(-\Delta Ct)}$, 得到 mRNA 的相對倍率數據圖表 (圖十一至圖十三)。

3.4.1 CL 合成與 CL 重塑相關蛋白 mRNA 表達量

利用 RT-PCR 分析 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相關的基因 mRNA 表現量, 控制組為 Hap1 細胞與實驗組 ΔTAZ 細胞。分析 *CDS1* 表達量, 由於 ΔTAZ 細胞表達量誤差值增加, 與 Hap1 細胞比較並無明顯變化。*PGS1* 表達量 ΔTAZ 細胞與 Hap1 細胞相比下降為 0.6 倍, 推測 ΔTAZ 細胞 *PGS1* 表達量減少。*CRLS* 表達量在 ΔTAZ 細胞表達量降低 0.57 倍, 推測 ΔTAZ 細胞 *CRLS1* 表達量減少。*TAZ* 表達量部分由於 ΔTAZ 細胞表達量降低 0.36 倍, 推測 ΔTAZ 細胞 *TAZ* 表達量減少。*LCLAT1* 的表達量在 ΔTAZ 細胞與 Hap1 細胞相比下降為 0.5 倍, 推測 ΔTAZ 細胞 *LCLAT1* 表達量減少。而 *FADS2* 表達量在 ΔTAZ 細胞與 Hap1 細胞相比則沒有明顯的變化。

分析細胞能量代謝中 mRNA 表達量, ΔTAZ 細胞中 *PGS1* 基因與 *CRLS1* 基因表現降低, 證實初期在 ΔTAZ 細胞中 PG 合成減少, 且 CL 的合成降低。而 *LCLAT1* 基因表達量下降, 可能會使具三條醯基鏈的 MLCL 無法重塑成四條醯基鏈的 CL。



圖十一、Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中 CL 合成與 CL 重塑相關蛋白 mRNA 表達量圖

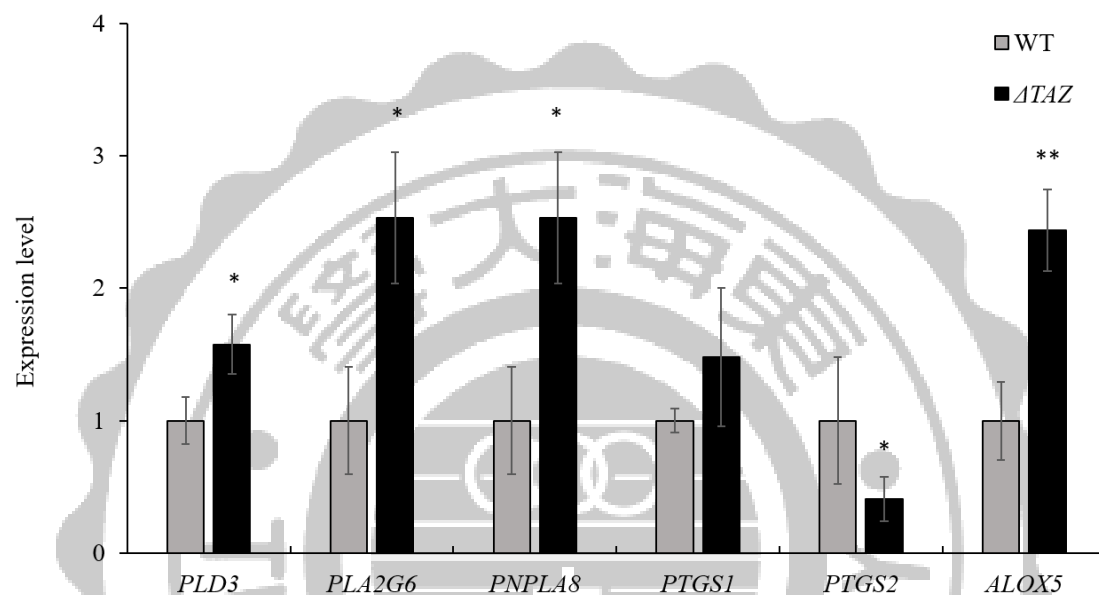
由左而右依序為 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。*CDS1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞相對比率。*PGS1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞相對比率。*CRLS1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞相對比率。*TAZ* 在 W.T. 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*LCLAT1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞相對比率。*FADS1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.4.2 CL 水解和細胞發炎反應相關蛋白 mRNA 表達量

分析 CL 水解相關蛋白 mRNA 表達量 *PLD3* 表達量在 ΔTAZ 細胞比 Hap1 細胞增加 0.5 倍。 ΔTAZ 細胞組與 Hap1 細胞組中 *PLA2G6* 表達量相比增加了 2 倍。 ΔTAZ 細胞組與 Hap1 細胞組中 *PNPLA8* 表達量相比增加了 2 倍。細胞發炎相關蛋白 mRNA 表達量 *PTGS1* 表達量由於 ΔTAZ 細胞表達量誤差值增加，與 Hap1

細胞比較並無明顯變化。*PTGS2* 表達量在 ΔTAZ 細胞表達量下降為 Hap1 細胞 0.4 倍。*ALOX5* 表達量在 ΔTAZ 細胞比 Hap1 細胞增加 2.4 倍。

CL 水解相關基因 *PLA2G6*、*PNPLA8* 和 *PLD3* 表達量在 ΔTAZ 細胞中皆增加，表示 ΔTAZ 細胞可能比 Hap1 細胞具有更高的水解 CL 效率。



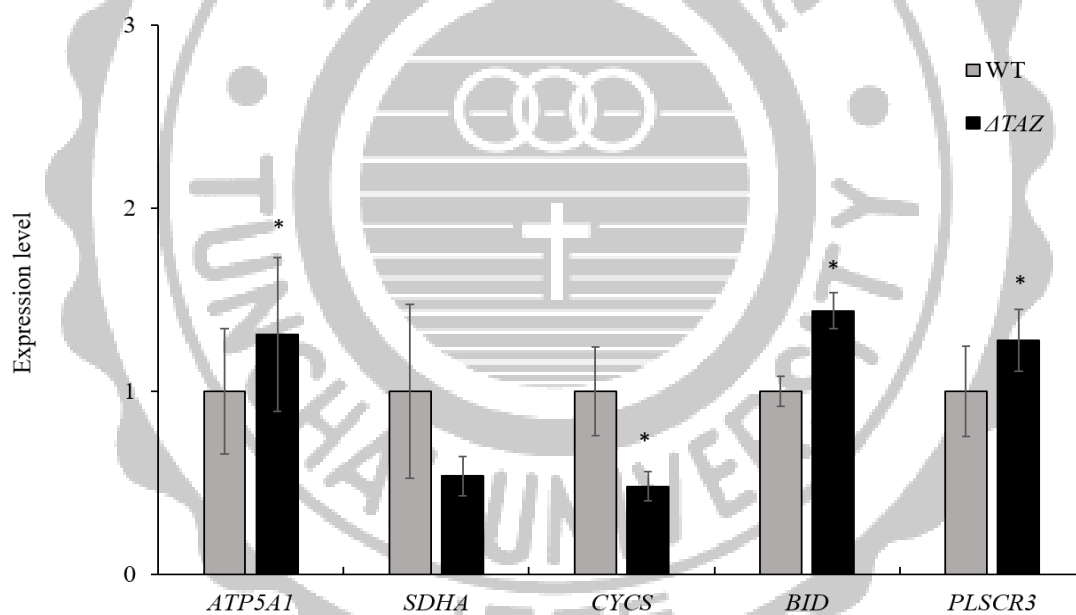
圖十二、Hap1 細胞組與 ΔTAZ 細胞 CL 水解和細胞發炎的相關蛋白 mRNA 表達量圖

由左而右依序為 Hap1 細胞、 ΔTAZ 細胞，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。*PLD3* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*PLA2G6* 在 W.T. 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*PNPLA8* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*PTGS1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*PTGS2* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*ALOX5* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.4.3 能量代謝與細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量

分析細胞能量代謝基因 *ATP5A1* 表達量在 ΔTAZ 細胞與 Hap1 細胞相比增加 0.3 倍。*SDHA* 表達量由於 Hap1 細胞表達量誤差值增加，與 Hap1 細胞相比變化不明顯。細胞凋亡相關基因 *CYCS* 表達量在 ΔTAZ 細胞下降為 Hap1 細胞的 0.5 倍。*BID* 表達量 ΔTAZ 細胞上升為 W.T.細胞的 1.4 倍。*PLSCR3* 表達量在 ΔTAZ 細胞上升為 Hap1 細胞的 1.2 倍。

觀察細胞能量代謝基因 *ATP5A1* 表達量增加，推測 Hap1 細胞產生的能量比 ΔTAZ 細胞多。推測剔除 *TAZ* 後影響細胞中 CL 組成與粒線體，因此 ΔTAZ 細胞的細胞凋亡基因 *BID* 和 *PLSCR3* 在 ΔTAZ 細胞中表達量增加。



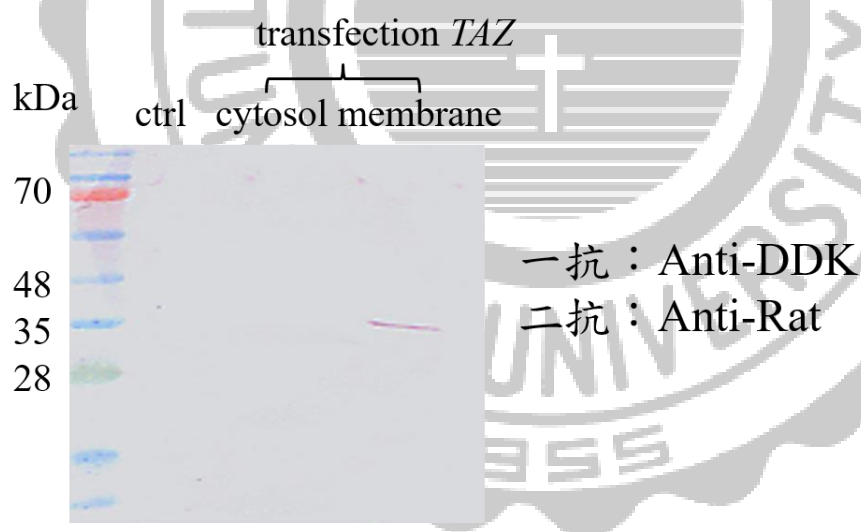
圖十三、Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞 CL 能量代謝與細胞凋亡相關蛋白 mRNA 表達量。

由左而右依序為 Hap1 細胞、 ΔTAZ 細胞，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。*ATP5A1* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*SDHA* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*CYCS* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中相對比率。*BID* 在 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中

相對比率。*PLSCR3* 在 Hap1 細胞與 Δ TAZ 細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算, * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)。

3.5 Hap1 Δ TAZ 細胞 transfection TAZ 使用 Western Blot 偵測蛋白轉染

利用抗體專一結合抗原蛋白質的原理, 並通過分析位置和深度, 其特定蛋白質在細胞中的表現情況, 第一條 lane 位置為 marker, 第二條 lane 位置以 Δ TAZ 細胞作為 Ctrl 組, 第三條 lane 是位置 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 培養 48 小時後的 Δ TAZ 細胞上清液, 第四條 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 培養 48 小時後細胞膜, 從膜上的 marker 中 28 到 35 kDa 位置中有一條 33.5 kDa 的 band 即為 TAZ 蛋白, 而 Ctrl 組和上清液則沒有出現, 代表 TAZ 轉染成功細胞產生 TAZ 蛋白, 且 TAZ 蛋白位於細胞膜上。

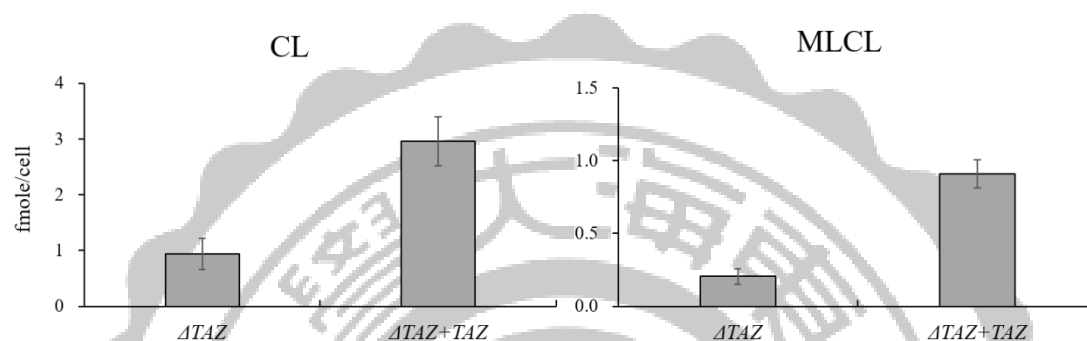


圖十四、轉染 TAZ 後的 Δ TAZ 細胞質 membrane 圖。

Control 組為 Hap1 Δ TAZ 細胞膜, Δ TAZ 細胞 transfection Tafazzin 培養 48 小時後收細胞進行蛋白質定量。進行 SDS page, 一級抗體使用 Tag (DDK) 1 : 2000, 二級抗體 anti-Rat 1:7500。

3.6 Hap1 Δ TAZ 細胞經轉染 TAZ 後對 CL 和 MLCL 組成之影響

Δ TAZ 細胞中 CL 的總量為 0.90 fmole，MLCL 的總量上升為 0.016 fmole，CL/MLCL 的比值為 56.3 倍。 Δ TAZ 轉染 TAZ 後細胞中 CL 的總量為 2.89 fmole，MLCL 的總量上升為 0.022 fmole，CL/MLCL 的比值為 131 倍。 Δ TAZ 細胞經過轉染 TAZ 後細胞中 CL 總量上升，而 MLCL 總量則無變化。

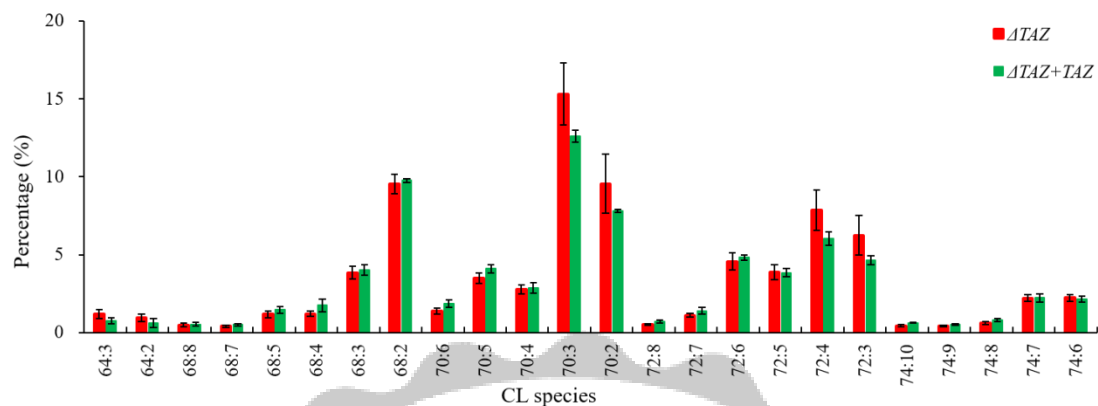


圖十五、 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 之 CL 與 MLCL 總量圖

Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 培養 48 小時後，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，單顆細胞中 CL 與 MLCL 總量圖。

3.6.1 Hap1 Δ TAZ 細胞經轉染 TAZ 對 CL 組成之定量分析

Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 培養 48 小時後，再經過脂質萃取後使用逆相層析分離與串聯質譜分析細胞中 CL 含量組成，發現其中 CL(68:3)、CL(68:2)和 CL(70:3)這三個 CL 主要由 Acyl(18:1)組成，其中 4 個 Acyl(18:1)的 CL(72:4)增加最多，整體的 Acyl18 明顯上升而 Acyl16 相對下降，飽和度則趨向含 4 個雙鍵的種類，表示經過轉染 TAZ 基因後，TAZ 蛋白進行醯基轉移酶功能，將 Acyl(18:1)組成 CL 或重塑機制中。CL(68:7)的組成中有 3 個 Acyl(16:1)，轉染 TAZ 基因後 CL(68:3)、CL(68:2)、CL(70:2)與 CL(72:3)的含量減少。



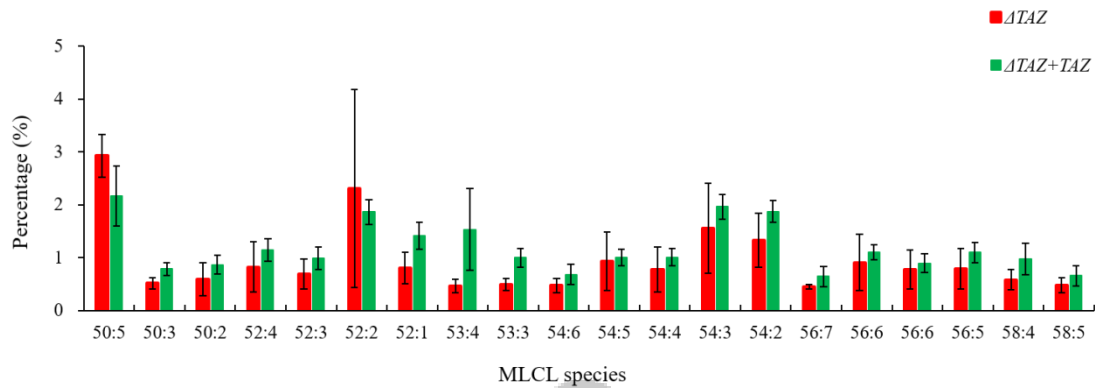
圖十六、 Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中 24 種 CL 組成比率圖。

Hap1 Δ TAZ 細胞與轉染 TAZ 到 Δ TAZ 細胞培養 48 小時後，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，所得總細胞 CL species 含量圖。

3.6.2 Hap1 Δ TAZ 細胞經 transfection TAZ 後 MLCL 組成之定量分析

Hap1 Δ TAZ 細胞與轉染 TAZ 到 Δ TAZ 細胞培養 48 小時，經過脂質萃取與固相萃取後，使用逆相層析分離與串聯質譜分析細胞中 CL 含量組成，其中由(18:1)₃組成的 MLCL(54:3) 含量在經過轉染 TAZ 後含量降低，由(18:1)₂(18:0)組成的 MLCL(54:2)含量則是增加。

證實經過轉染後的細胞中 TAZ 具有醯基轉移的功能，且偏向醯基鏈(18:1)組成的 MLCL 飽和度改變，將醯基鏈(18:1)置換成(18:0)，達到重塑醯基的功能。



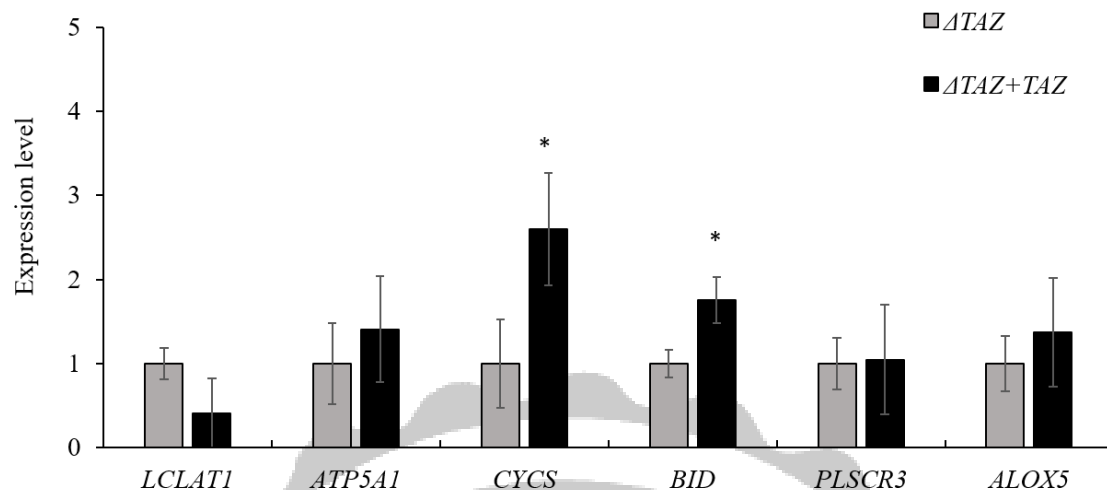
圖十七、 Hap1 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中 20 種 MLCL 組成比率圖

Hap1 ΔTAZ 細胞與轉染 TAZ 到 ΔTAZ 細胞培養 48 小時後，加入定量內標準品 CL (14:0) 使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，所得總細胞 MLCL species 含量圖。

3.7 CL 重塑與與能量代謝和發炎反應與細胞凋亡相關 mRNA 表達量

分析 CL 重塑相關蛋白 mRNA 表達量 *LCLATI* 表達量與 ΔTAZ 細胞分析比較，由於 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後表達量誤差值增加，與 ΔTAZ 細胞比較無明顯變化。細胞能量基因 *ATP5A1* 表達量 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後與 ΔTAZ 細胞相比沒有變化。細胞凋亡基因 *CYCS* 表達量在與 ΔTAZ 細胞比較分析中，轉染 TAZ 比較 ΔTAZ 細胞增加 4 倍。*BID* 表達量在 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後增加 0.7 倍，*PLSCR3* 表達量無明顯變化。細胞發炎基因 *ALOX5* 表達量 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後相比沒有明顯的變化。

觀察重塑 MLCL 的 *LCLATI* 基因表達在 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後沒有改變，推測轉染 TAZ 後不會影響。細胞凋亡基因 *CYCS* 和 *BID* 表達量增加，可能是 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後，促發凋亡因子使細胞凋亡相關基因表達增加。



圖十八、 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 的相關蛋白 mRNA 表達量圖

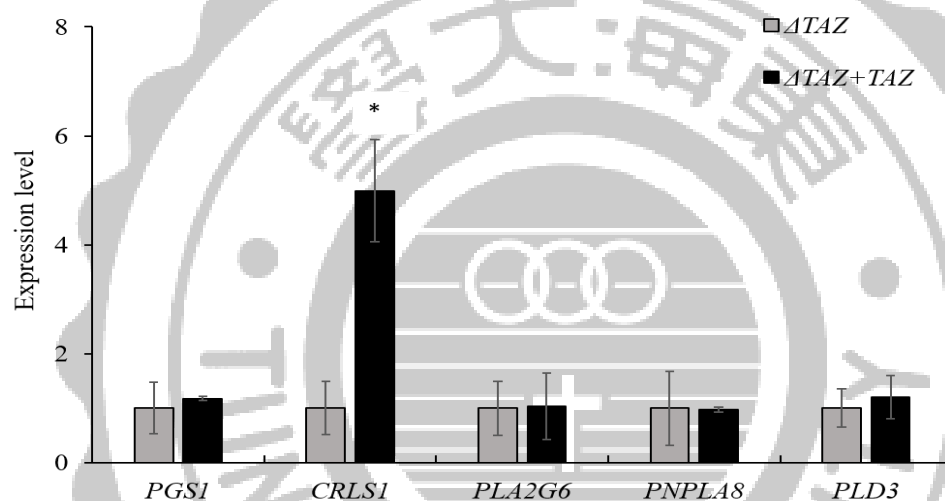
ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ*，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。由左而右依序為 *LCLAT1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。*ATP5A1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。*CYCS* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。*BID* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。*PLSCR3* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。*ALOX5* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.7.1 CL 合成與 CL 水解和 CL 重塑相關 mRNA 表達量

PGS1 調控 PG 合成，*PGS1* 表達量在與 ΔTAZ 細胞比較的分析中， ΔTAZ 細胞表達量誤差值增加，與 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 比較無明顯變化。*CRLS1* 為合成 CL 的重要蛋白，其基因表達量在 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後與 ΔTAZ 細胞相比增加 4 倍。*PLA2G6* 水解 CL 相關蛋白表達量在與 ΔTAZ 細胞比較的分析中， ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後表達量誤差值增加，與 ΔTAZ 細胞無明顯變化。*PNPLA8* 水解 CL 相關蛋白表達量在 ΔTAZ 細胞轉染 *TAZ* 後無明顯變化。*PLD3* 水解 CL 相關

PLD 家族蛋白表達量 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後相比沒有明顯的變化。

經過質譜鑑定轉染 TAZ 後 ΔTAZ 細胞，CL 與 MLCL 含量並沒有完全回復到 W.T. 細胞的 CL 含量。其中較特別的是，實驗中 ΔTAZ 細胞經過轉染後，合成心磷脂的 *CRLS1* 基因增加，推測 *CRLS1* 基因被大量被表達的原因，可能是在具有 TAZ 功能的細胞中，需要更多的 CL 作為進行醯基轉移化的原料。由於 CL 水解路徑的基因 *PLA2G6* 與 *PNPLA8* 和 *PLD3* 表達量皆沒有變化，證實質譜的觀察 ΔTAZ 細胞經過 TAZ 轉染後，細胞中 MLCL 含量不變。

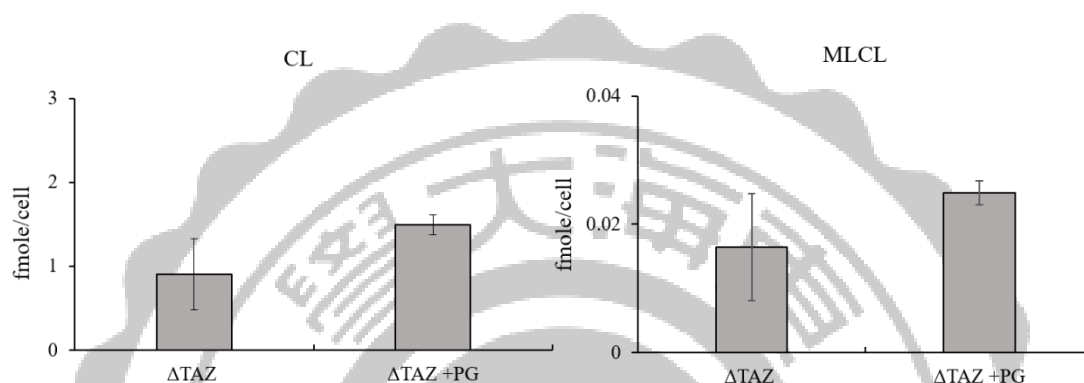


圖十九、 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 的相關蛋白 mRNA 表達量圖

ΔTAZ 細胞、 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。由左而右依序為 *PGS1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。*CRLS1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。*PLA2G6* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。*PNPLA8* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。*PLD3* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。TAZ 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞轉染 TAZ 後細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.8 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 之 CL 與 MLCL 總量

Δ TAZ 細胞中 CL 的總量為 0.90 fmole，MLCL 的總量上升為 0.016 fmole，CL/MLCL 的比值為 56.3 倍。 Δ TAZ 細胞中 CL 的總量為 1.40 fmole，MLCL 的總量上升為 0.023 fmole，CL/MLCL 的比值為 60.9 倍。 Δ TAZ 細胞經過添加 PG 後細胞中 CL 總量上升，MLCL 含量增加。



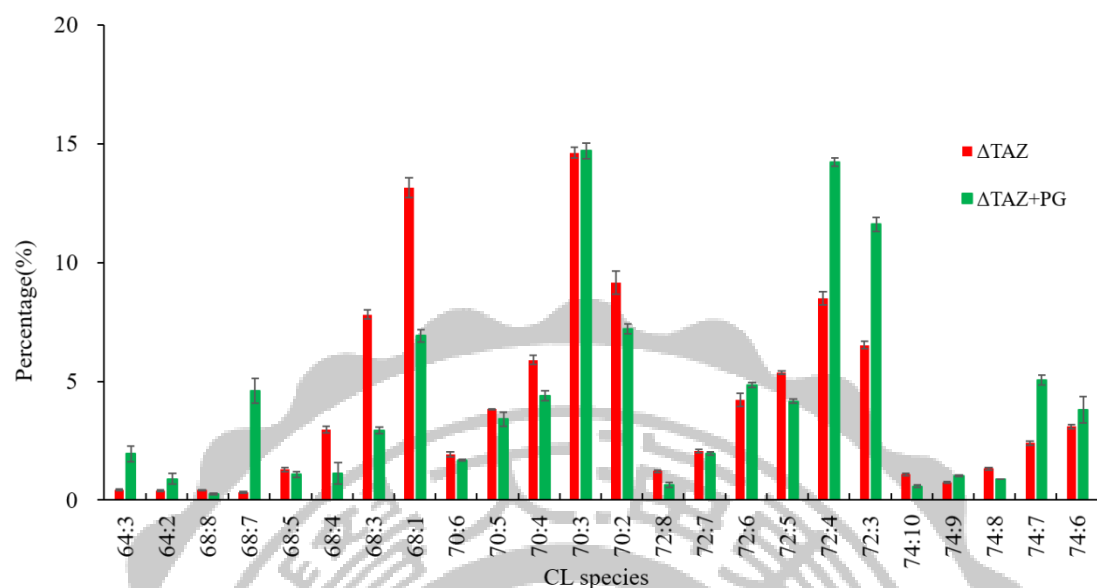
圖二十、 Hap1 Δ TAZ 細胞與添加 PG 後 Δ TAZ 細胞中 CL 與 MLCL 總量圖

Hap1 Δ TAZ 細胞和添加 PG 培養 48 小時後，加入內標準品 CL (14:0) 定量，使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，單顆細胞中 CL 與 MLCL 總量圖。

3.8.1 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 後對 CL 組成之定量分析

Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG(18:1)₂ 後，經過脂質萃取後使用相向層析分離與串聯質譜分析細胞中 CL 含量組成，其中 CL(70:3)和 CL(72:4)和 CL(72:3)這三個 CL 主要由 Acyl(18:1)組成，其中 4 個 Acyl(18:1)的 CL(72:4)增加最多，整體的 Acyl18 明顯上升而 Acyl16 相對下降，飽和度則趨向含 4 個雙鍵的種類，表示 PG(18:1)₂ 的 Acyl(18:1)有效的進入 CL 合成或重塑機制中。CL(68:4)的組成中有 2 個對稱於不同側的 Acyl(18:1)，但是加入 PG(18:1)₂ 後 CL(70:6)與 CL(72:8)的含

量明顯降低。

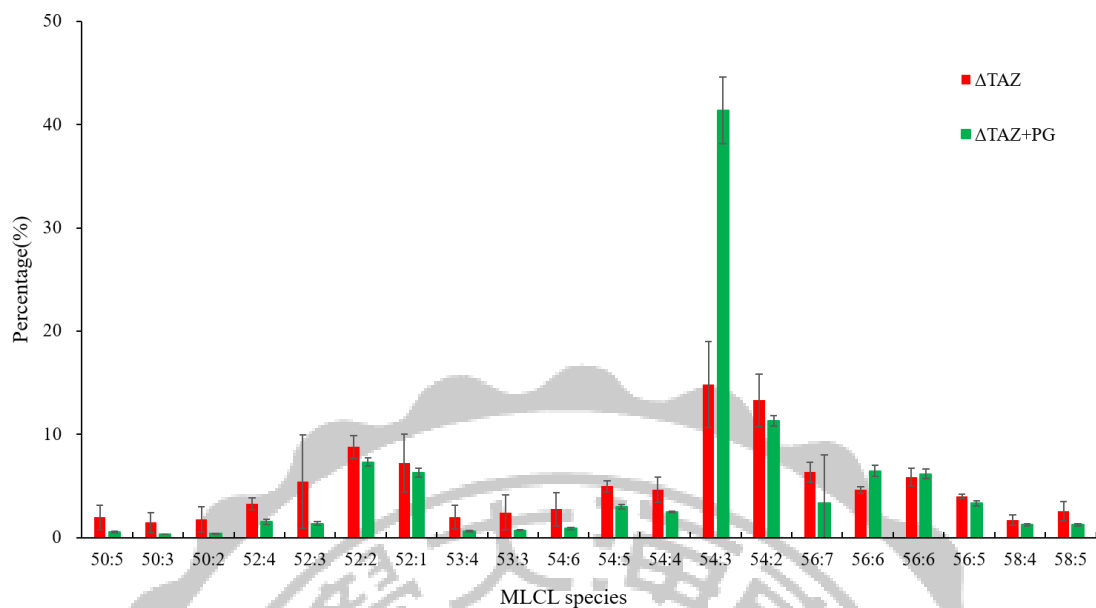


圖二十一、添加 PG 的 Hap1 Δ TAZ 細胞中 24 種 CL 組成比率圖。

Hap1 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG48 小時，加入內標準品 CL (14:0) 定量，使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，所得總細胞 CL species 含量圖。

3.8.2 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 後對 MLCL 組成之定量分析

Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG(18:1)₂ 後，經過脂質萃取後使用逆相層析分離與串聯質譜分析細胞中 CL 含量組成，其中 MLCL(54:3) 主要由三個 Acyl(18:1) 組成的增加最多。



圖二十二、 添加 PG 的 Hap1 Δ TAZ 細胞中 20 種 MLCL 組成比率圖。

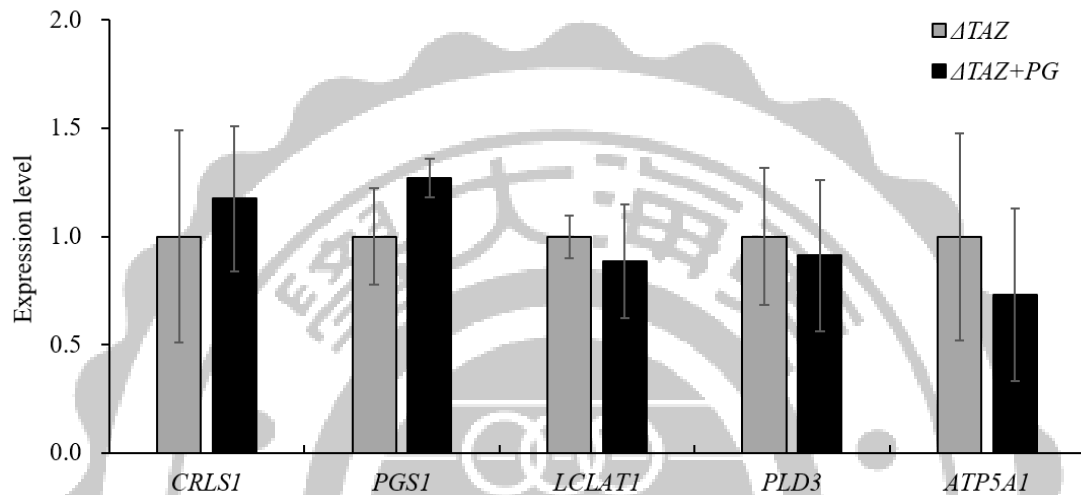
Hap1 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG 培養 48 小時，加入內標準品 CL(14:0) 定量，使用 Bligh Dyer 方法進行總脂質萃取，由 LC-MS 測得的分析樣品使用 Extracted-ion chromatogram (EIC)、Peak intensity 的強度進行相對定量圖，所得總細胞 MLCL species 含量圖。

3.9 Hap1 Δ TAZ 細胞添加 PG 之 CL 合成、重塑、水解與能量合成相關 mRNA 表達量

利用 RT-PCR 分析 Hap1 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG，相關的基因 mRNA 表現量，控制組為 Δ TAZ 細胞與實驗組 Δ TAZ 細胞添加 PG。分析 *CRLS1* 表達量在細胞 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG 相比無明顯變化。*PGS1* 表達量在與 Δ TAZ 細胞比較的分析中， Δ TAZ 細胞表達量誤差值增加，與 Δ TAZ 細胞添加 PG 後比較無明顯變化。*LCLAT1* 表達量在細胞 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG 相比無明顯變化。*PLD3* 表達量 Δ TAZ 細胞與 Δ TAZ 細胞添加 PG 後相比沒有明顯的變化。*ATP5A1* 表達量在與 Δ TAZ 細胞比較的分析中， Δ TAZ 細胞表達量誤差

值增加，與 ΔTAZ 細胞添加 PG 後比較無明顯變化。

添加 PG 的 ΔTAZ 細胞 *PGS1* 基因表達並沒有改變，推測 ΔTAZ 細胞不會因為添加 PG 影響 CL 合成效率。添加合成心磷脂原料 PG 進入 ΔTAZ 細胞後，*LCLAT1* 基因表達量沒有改變，推測添加 PG 不會影響 *LCLAT1* 基因改變。



圖二十三、 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞添加 PG 的相關蛋白 mRNA 表達量圖

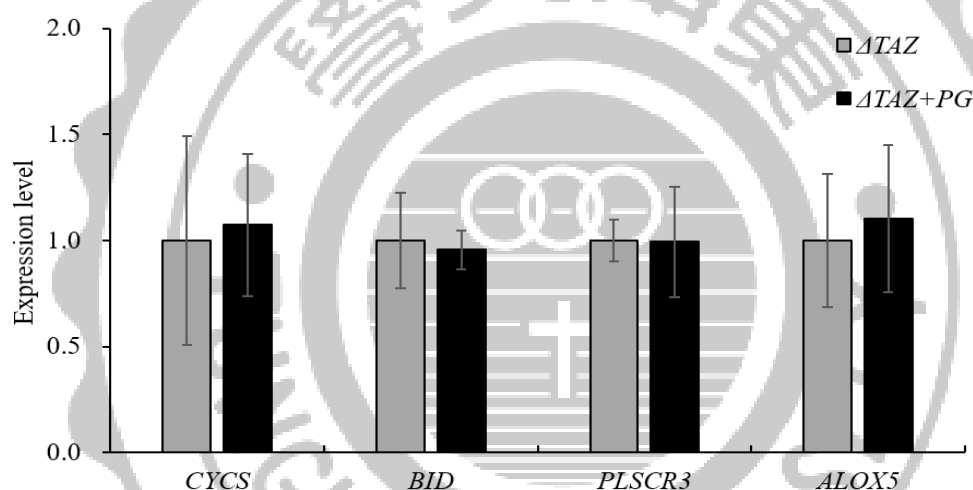
ΔTAZ 細胞、 ΔTAZ 細胞添加 PG 培養 48 小時後，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。由左而右依序為 *CRLS1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*PGS1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*LCLAT1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*PLD3* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*ATP5A1* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.9.1 Hap1 ΔTAZ 細胞添加 PG 之細胞凋亡與細胞發炎相關 mRNA 表達量

分析細胞凋亡蛋白相關 mRNA 表達量，*CYCS* 表達量在與 ΔTAZ 細胞比較的分析中， ΔTAZ 細胞表達量誤差值增加，與 ΔTAZ 細胞添加 PG 後比較無明顯變

化。*BID* 表達量在細胞 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞添加 PG 相比無明顯變化。*PLSCR3* 表達量在細胞 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞添加 PG 相比無明顯變化。調控細胞發炎 *ALOX5* 表達量在與 ΔTAZ 細胞比較的分析中， ΔTAZ 細胞表達量誤差值增加，與 ΔTAZ 細胞添加 PG 後比較無明顯變化。

添加 PG 的 ΔTAZ 細胞中細胞凋亡與細胞發炎相關基因無明顯變化，推測添加合成心磷脂的原料 PG 進入 ΔTAZ 細胞時，不會受到額外添加 PG 的影響，產生發炎反應或是使細胞凋亡。



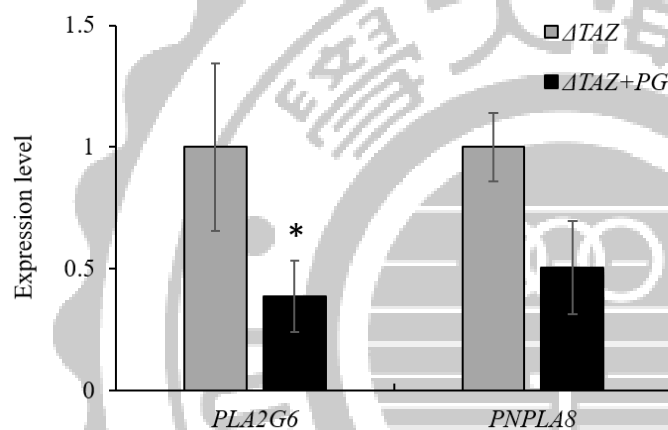
圖二十四、 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞添加 PG 的相關蛋白 mRNA 表達量圖

ΔTAZ 細胞、 ΔTAZ 細胞添加 PG，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。由左而右依序為 *CYCS* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*BID* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*PLSCR3* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*ALOX5* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

3.9.2 Hap1 ΔTAZ 細胞添加 PG 之 CL 水解相關 mRNA 表達量

分析 CL 水解相關蛋白的 mRNA 表達，*PLA2G6* 表達量細胞 ΔTAZ 細胞添加 PG 後與 ΔTAZ 細胞相比減少 2.6 倍。*PNPLA8* 表達量細胞 ΔTAZ 細胞添加 PG 後與 ΔTAZ 細胞相比減少 2 倍。

添加 PG 的 ΔTAZ 細胞中調控水解 CL 的 *PNPLA8* 和 *PLA2G6* 基因表現量降低，推測添加 PG 會使 ΔTAZ 細胞的 CL 水解代謝速率降低。



圖二十五、 ΔTAZ 細胞與 ΔTAZ 細胞添加 PG 的相關蛋白 mRNA 表達量圖

ΔTAZ 細胞、 ΔTAZ 細胞添加 PG，經過抽取 mRNA 後反轉錄 cDNA，藉由 RT-PCR 分析放大曲線，內校正使用 *GAPDH* 做為參考基因。由左而右依序為 *PLA2G6* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。*PNPLA8* 在 ΔTAZ 細胞和 ΔTAZ 細胞添加 PG 後細胞中相對比率。(統計皆以 T-test 計算，* ≤ 0.05 ，** ≤ 0.01 ，*** ≤ 0.001)。

第四章、討論

細胞經總脂質萃取後，使用質譜儀檢測 Hap1 細胞與 ΔTAZ 細胞中 CL 和 MLCL 組成與差異，發現在 CL(70:3)、CL(70:4)、CL(72:4)、CL(72:5)、CL(72:6) 和 CL(72:7)等多個種類的心磷脂明顯增加，推測 ΔTAZ 細胞中的 CL 組成偏向 Acyl16，且在 ΔTAZ 細胞出現特定 CL 組成，觀察 Hap1 細胞和 ΔTAZ 細胞其心磷脂的不同且含量差異。細胞中的心磷脂由一些合成與水解相關蛋白作為調控，我們使用 RT-PCR 觀察這些相關蛋白的 mRNA 表達量， ΔTAZ 細胞的 CL 重塑相關蛋白 TAZ 表達量降低。且在分析細胞能量代謝中 mRNA 表達量， ΔTAZ 細胞所需要的能量比 Hap1 細胞多，而 ΔTAZ 細胞在 CL 合成途徑中合成的 CL 比 Hap1 細胞少，證實合成 CL 相關蛋白其 mRNA 在 ΔTAZ 細胞中，除了 *PGSI* 減少基因表現外，與其他相關 CL 合成基因影響並不大，推測初期 PG 合成 CL 時 ΔTAZ 細胞比 Hap1 細胞少。 ΔTAZ 細胞中 *LCLAT1* 基因表達量下降，使具三條醯基鏈的 MLCL 無法重塑成四條醯基鏈組成的 CL，導致 ΔTAZ 細胞中 MLCL 的累積增加。觀察 ΔTAZ 細胞中 CL 水解相關蛋白的 *PLA2G6* 表達量與 *PNPLA8* 和 *PLD3* 表達量皆為增加，使細胞中 CL 的水解作用增加，導致 ΔTAZ 細胞中 MLCL 的含量累積。由於 CL 是存在粒線體內膜上重要的磷脂質，調控細胞凋亡以及參與細胞能量合成。粒線體的功能改變時，進而影響細粒線體的活性，當 ΔTAZ 細胞添加 Oligomycin 後運作極限比細胞標準呼吸率低，推測細胞粒線體已經損傷，無法回復到細胞基礎呼吸耗氧率標準。實驗中觀察發現 ΔTAZ 細胞粒線體中電子傳遞鏈的耗氧率比 Hap1 細胞低，證實 ΔTAZ 細胞粒線體運作極限降低。且透過電子顯微鏡觀察粒線體型態，當 TAZ 基因剔除後，導致細胞中粒線體的聚集和粒線體內膜形狀變異，且影響到粒線體的活性，證實 TAZ 基因剔除後細胞的粒線體功能與型態都改變，且 CL 與 MLCL 含量與組成都受到影響。

MLCL 為 CL 的代謝產物，MLCL 的生成與 tafazzin 調節相關，分析實驗中 CL 與 MLCL 的組成變化並相互比較，將 TAZ 基因轉入 Δ TAZ 細胞，使用西方墨點法確認 TAZ 基因在細胞內膜上。細胞轉染後經過質譜鑑定，發現 Δ TAZ 細胞經過轉染 TAZ 後細胞中 CL 與 MLCL 總量上升，但 MLCL 組成總體無明顯變化，證實 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 後具有醃基化功能且偏向 Acyl (18:1) 組成，使 CL(70:3)、CL(70:2)、CL(72:4) 和 CL(72:3) 含量增加，推測心磷脂經過 Tafazzin 醃基轉移酶功能將原本 CL 組成中飽和 Acyl(16:0) 和 Acyl(18:0) 置換成不飽和 Acyl (18:1)，心磷脂重塑的途徑中會使不飽和的心磷脂增加。然而 MLCL 的總量並沒有降低到 Hap1 細胞的含量，可能是因為轉染的 TAZ 無法取代 Hap1 細胞原生的 Tafazzin 蛋白，因此轉染的 Δ TAZ 細胞 CL 含量雖然有增加，但是並無影響到細胞中其他 CL 相關的蛋白調控。使用 RT-PCR 對細胞中 mRNA 進行定量，觀察細胞中的基因表達，經過轉染後 Δ TAZ 細胞並沒有完全回復到 Hap1 細胞的基因表達量，且調控 MLCL 重塑的 LCLAT1 的基因表達與水解 CL 的基因 *PLA2G6* 表達量與 *PNPLA8* 和 *PLD3* 表達皆沒有變化，可能是重塑 CL 途徑的 TAZ 影響 MLCL 含量增加的原因。其中較特別的是，實驗中 Δ TAZ 細胞經過轉染後，合成心磷脂的 *CRLS1* 基因增加，推測 *CRLS1* 基因大量被表達的原因可能是在具有 TAZ 功能的細胞中，需要更多的 CL 作為進行醃基轉移酶的原料。

添加合成心磷脂的原料 PG(18:1)₂，使 Δ TAZ 細胞在有合成 CL 原料的狀態下合成心磷脂，預計會使 CL 含量上升，而 MLCL 含量也會受改變。經過質譜鑑定發現 CL(70:3)、CL(72:3)、CL(72:4) 和 CL(72:5) 等多個種類有明顯的增加，而 MLCL 的種類變化為單一的 MLCL(54:3) 的提升。MLCL(54:3) 即為含有 3 個 Acyl(18:1) 的 MLCL，推測 CL 代謝成 MLCL 時，醃基鏈具有選擇性，可能是代謝時 Acyl(18:1) 較容易被保留，其中 CL(70:6) 和 CL(72:8) 減少，推測是被水解為 MLCL(54:3)。又或者因為含有四個 (18:1) 醃基鏈組成的 CL(72:4) 超出需求而被水解為 MLCL(54:3)。經過 RT-PCR 測定，添加 PG 的 Δ TAZ 細胞中 *PNPLA8* 和 *PLA2G6*

基因表現量降低，其他的基因則無明顯變化，推測導致 CL 含量增加且 CL 不會被水解的代謝機制。比較特別的是 *LCLAT1* 基因表達量並無變化，導致 MLCL 總含量變異較低，推論添加合成心磷脂的原料 PG 進入 ΔTAZ 細胞時，確實會使 ΔTAZ 細胞心磷脂含量增加。預測添加 PG 會使 *PGS1* 增加，但是經過 RT-PCR 鑑定發現 *PGS1* 基因表達並沒有改變，推測細胞不會因為額外添加 PG 的影響 PG 合成酶，並且在心磷脂的定量中使 ΔTAZ 細胞中的心磷脂合成增加。

轉染 *TAZ* 到 ΔTAZ 細胞內改善心磷脂組成，使 CL 醯基鏈不飽和度增加且 CL 的含量上升，然而 MLCL 的含量也有上升的情形，或許可以改善巴氏症細胞模型，並達到短暫的治療效果。而當 ΔTAZ 細胞與 Hap1 細胞的心磷脂相比醯基鏈的不飽和降低，藉由添加 $PG(18:1)_2$ 改善心磷脂的組成，經過質譜鑑定發現添加 PG 無法改變 ΔTAZ 細胞的醯基鏈飽和度，並使特定的醯基鏈組成的心磷脂含量增加，因此未來可以嘗試轉染 *TAZ* 到細胞中恢復醯基轉移酶的功能，並搭配添加 $PG(18:2)_2$ 降低心磷脂的飽和度以回復不飽和心磷脂，達到完善的治療巴氏症的效果。

參考文獻

1. Barth, P. G.; Scholte, H. R.; Berden, J. A.; Van der Klei-Van Moorsel, J. M.; Luyt-Houwen, I. E.; Van 't Veer-Korthof, E. T.; Van der Harten, J. J.; Sobotka-Plojhar, M. A., An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci* **1983**, *62* (1-3), 327-55.
2. Angelini, R.; Lobasso, S.; Gorgoglione, R.; Bowron, A.; Steward, C. G.; Corcelli, A., Cardiolipin fingerprinting of leukocytes by MALDI-TOF/MS as a screening tool for Barth syndrome. *J Lipid Res* **2015**, *56* (9), 1787-94.
3. van Werkhoven, M. A.; Thorburn, D. R.; Gedeon, A. K.; Pitt, J. J., Monolysocardiolipin in cultured fibroblasts is a sensitive and specific marker for Barth Syndrome. *J Lipid Res* **2006**, *47* (10), 2346-51.
4. Hijikata, A.; Yura, K.; Ohara, O.; Go, M., Structural and functional analyses of Barth syndrome-causing mutations and alternative splicing in the tafazzin acyltransferase domain. *Meta Gene* **2015**, *4*, 92-106.
5. Brandner, K.; Mick, D. U.; Frazier, A. E.; Taylor, R. D.; Meisinger, C.; Rehling, P., Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* **2005**, *16* (11), 5202-14.
6. Kulik, W.; van Lenthe, H.; Stet, F. S.; Houtkooper, R. H.; Kemp, H.; Stone, J. E.; Steward, C. G.; Wanders, R. J.; Vaz, F. M., Bloodspot assay using HPLC-tandem mass spectrometry for detection of Barth syndrome. *Clin Chem* **2008**, *54* (2), 371-8.
7. Clarke, S. L.; Bowron, A.; Gonzalez, I. L.; Groves, S. J.; Newbury-Ecob, R.; Clayton, N.; Martin, R. P.; Tsai-Goodman, B.; Garratt, V.; Ashworth, M.; Bowen, V. M.; McCurdy, K. R.; Damin, M. K.; Spencer, C. T.; Toth, M. J.; Kelley, R. I.; Steward, C. G., Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **2013**, *8*, 23.
8. Malhotra, A.; Xu, Y.; Ren, M.; Schlame, M., Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin. 1. A novel transacylation mechanism to shuttle fatty acids between sn-1 and sn-2 positions of multiple phospholipid species. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1791* (4), 314-20.
9. Acehan, D.; Vaz, F.; Houtkooper, R. H.; James, J.; Moore, V.; Tokunaga, C.; Kulik, W.; Wansapura, J.; Toth, M. J.; Strauss, A.; Khuchua, Z., Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *J Biol Chem* **2011**, *286* (2), 899-908.
10. Khuchua, Z.; Yue, Z.; Batts, L.; Strauss, A. W., A zebrafish model of human Barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function. *Circ Res* **2006**, *99* (2), 201-8.
11. Dudek, J.; Cheng, I. F.; Balleininger, M.; Vaz, F. M.; Streckfuss-Bomeke, K.;

- Hubscher, D.; Vukotic, M.; Wanders, R. J.; Rehling, P.; Guan, K., Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res* **2013**, *11* (2), 806-19.
12. Xu, Y.; Zhang, S.; Malhotra, A.; Edelman-Novemsky, I.; Ma, J.; Kruppa, A.; Cernicica, C.; Blais, S.; Neubert, T. A.; Ren, M.; Schlame, M., Characterization of tafazzin splice variants from humans and fruit flies. *J Biol Chem* **2009**, *284* (42), 29230-9.
13. Xu, Y.; Condell, M.; Plesken, H.; Edelman-Novemsky, I.; Ma, J.; Ren, M.; Schlame, M., A Drosophila model of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (31), 11584-8.
14. Acehan, D.; Khuchua, Z.; Houtkooper, R. H.; Malhotra, A.; Kaufman, J.; Vaz, F. M.; Ren, M.; Rockman, H. A.; Stokes, D. L.; Schlame, M., Distinct effects of tafazzin deletion in differentiated and undifferentiated mitochondria. *Mitochondrion* **2009**, *9* (2), 86-95.
15. Beranek, A.; Rechberger, G.; Knauer, H.; Wolinski, H.; Kohlwein, S. D.; Leber, R., Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene CLD1 (YGR110W) in yeast. *J Biol Chem* **2009**, *284* (17), 11572-8.
16. Xu, Y.; Malhotra, A.; Ren, M.; Schlame, M., The enzymatic function of tafazzin. *J Biol Chem* **2006**, *281* (51), 39217-24.
17. Mosser, J.; Sarde, C. O.; Vicaire, S.; Yates, J. R.; Mandel, J. L., A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics* **1994**, *22* (2), 469-71.
18. Neuwald, A. F., Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency. *Curr Biol* **1997**, *7* (8), R465-6.
19. Valianpour, F.; Mitsakos, V.; Schlemmer, D.; Towbin, J. A.; Taylor, J. M.; Ekert, P. G.; Thorburn, D. R.; Munnich, A.; Wanders, R. J.; Barth, P. G.; Vaz, F. M., Monolysocardiolipins accumulate in Barth syndrome but do not lead to enhanced apoptosis. *J Lipid Res* **2005**, *46* (6), 1182-95.
20. Chen, S.; He, Q.; Greenberg, M. L., Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth. *Mol Microbiol* **2008**, *68* (4), 1061-72.
21. Gonzalez, I. L., Barth syndrome: TAZ gene mutations, mRNAs, and evolution. *Am J Med Genet A* **2005**, *134* (4), 409-14.
22. Xu, Y.; Sutachan, J. J.; Plesken, H.; Kelley, R. I.; Schlame, M., Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Lab Invest* **2005**, *85* (6), 823-30.
23. Bosetti, F.; Weerasinghe, G. R., The expression of brain cyclooxygenase-2 is down-regulated in the cytosolic phospholipase A2 knockout mouse. *J Neurochem* **2003**, *87* (6), 1471-7.

24. Pangborn, M. C., ISOLATION AND PURIFICATION OF A SEROLOGICALLY ACTIVE PHOSPHOLIPID FROM BEEF HEART. *Journal of Biological Chemistry* **1942**, 143 (1), 247-256.
25. Frentzen, M.; Griebau, R., Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. *Plant physiology* **1994**, 106 (4), 1527-1532.
26. Schlame, M.; Hostetler, K. Y., Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1348 (1-2), 207-13.
27. Schlame, M.; Brody, S.; Hostetler, K. Y., Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur J Biochem* **1993**, 212 (3), 727-35.
28. Schlame, M.; Ren, M.; Xu, Y.; Greenberg, M. L.; Haller, I., Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids* **2005**, 138 (1-2), 38-49.
29. (a) Robinson, N. C., Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* **1993**, 25 (2), 153-63; (b) Eble, K. S.; Coleman, W. B.; Hantgan, R. R.; Cunningham, C. C., Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **1990**, 265 (32), 19434-40.
30. Cristea, I. M.; Degli Esposti, M., Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem Phys Lipids* **2004**, 129 (2), 133-60.
31. Schlame, M., Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res* **2008**, 49 (8), 1607-20.
32. Tyurina, Y. Y.; Kini, V.; Tyurin, V. A.; Vlasova, I.; Jiang, J.; Kapralov, A. A.; Belikova, N. A.; Yalowich, J. C.; Kurnikov, I. V.; Kagan, V. E., Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: relevance to pro- and antiapoptotic functions of etoposide. *Mol Pharmacol* **2006**, 70 (2), 706-17.
33. Choi, S. Y.; Gonzalvez, F.; Jenkins, G. M.; Slomianny, C.; Chretien, D.; Arnoult, D.; Petit, P. X.; Frohman, M. A., Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ* **2007**, 14 (3), 597-606.
34. Kutik, S.; Rissler, M.; Guan, X. L.; Guiard, B.; Shui, G.; Gebert, N.; Heacock, P. N.; Rehling, P.; Dowhan, W.; Wenk, M. R.; Pfanner, N.; Wiedemann, N., The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *J Cell Biol* **2008**, 183 (7), 1213-21.
35. Rijken, P. J.; Houtkooper, R. H.; Akbari, H.; Brouwers, J. F.; Koorengel, M. C.; de Kruijff, B.; Frentzen, M.; Vaz, F. M.; de Kroon, A. I., Cardiolipin molecular species with shorter acyl chains accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking the acyl coenzyme A-binding protein Acb1p: new insights into acyl chain remodeling of cardiolipin. *J Biol Chem* **2009**, 284 (40), 27609-19.

36. Tian, H. F.; Feng, J. M.; Wen, J. F., The evolution of cardiolipin biosynthesis and maturation pathways and its implications for the evolution of eukaryotes. *BMC evolutionary biology* **2012**, *12*, 32.
37. Chicco, A. J.; Sparagna, G. C., Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American journal of physiology. Cell physiology* **2007**, *292* (1), C33-44.
38. Carman, G. M., An unusual phosphatidylethanolamine-utilizing cardiolipin synthase is discovered in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (41), 16402-3.
39. Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y. H.; Magrioti, V.; Kokotos, G., Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews* **2011**, *111* (10), 6130-85.
40. Williams, S. D.; Gottlieb, R. A., Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A(2) (iPLA(2)) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J* **2002**, *362*, 23-32.
41. Gadd, M. E.; Broekemeier, K. M.; Crouser, E. D.; Kumar, J.; Graff, G.; Pfeiffer, D. R., Mitochondrial iPLA2 activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (11), 6931-9.
42. Saric, A.; Andreau, K.; Armand, A. S.; Moller, I. M.; Petit, P. X., Barth Syndrome: From Mitochondrial Dysfunctions Associated with Aberrant Production of Reactive Oxygen Species to Pluripotent Stem Cell Studies. *Front Genet* **2015**, *6*, 359.
43. (a) Linnett, P. E.; Beechey, R. B., Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol* **1979**, *55*, 472-518; (b) Mehdipour, A. R.; Hummer, G., Cardiolipin puts the seal on ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (31), 8568-70.
44. Levenson, R.; Macara, I. G.; Smith, R. L.; Cantley, L.; Housman, D., Role of mitochondrial membrane potential in the regulation of murine erythroleukemia cell differentiation. *Cell* **1982**, *28* (4), 855-63.
45. Park, K. S.; Jo, I.; Pak, K.; Bae, S. W.; Rhim, H.; Suh, S. H.; Park, J.; Zhu, H.; So, I.; Kim, K. W., FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch* **2002**, *443* (3), 344-52.
46. To, M. S.; Aromataris, E. C.; Castro, J.; Roberts, M. L.; Barritt, G. J.; Rychkov, G. Y., Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *495* (2), 152-8.
47. Singer, T. P., Mitochondrial electron-transport inhibitors. *Methods Enzymol* **1979**, *55*, 454-62.

48. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification.
Can J Biochem Physiol **1959**, 37 (8), 911-7.

