

東海大學化學系研究所碩士論文

指導教授:許員豪 博士

質譜分析 *TAZ* 基因剔除與修正細
胞中磷脂質組成

Mass Spectrometry Analysis of the *TAZ*
Knockout and the Amendment of the
Phospholipid Compositions in the Cell

碩士研究生:陳映志

中華民國一零八年六月

致謝

感謝成長之途一路上遇見以及提拔我的貴人。當初高中以一分之差考到了外縣市的高中，因為基隆高中吳仁輝老師的一封推薦信讓我得到了東海大學化學系的備取資格，讓我幸運進入到東海大學認識了承翰、宜欣、志以、艾茵與璟儀，沒有你們不經意的努力在無形中給予了我向上攻讀研究所的念頭。

到了研究所要感謝依婷、翊銓、庭遠學長姐傳承給我氫氙交換分析酵素結構與酵素的表達定性及基因修飾與電穿孔轉染技術，還有菀芯、朱怡、冠霖學長姐帶給我的細胞培養與磷脂質的萃取與分析的經驗與知識，以及元璋同學、育寧、若雲、明軒、文睿、承德學弟妹的協助以及佳儀、景元、岱漪、明薇、瑀彤、雅惠讓實驗是更有青春洋溢的氣息。其中要特別感謝許員豪老師收我為研究生，橫跨 9000 公里的距離至斯洛伐克國家科學院實習這難得可貴的經歷，也讓我多年來在實驗室裡不斷地汲取各類知識與技術使我能在實習期間能得心應手地進行各種實驗。

最後最感謝的是爸爸媽媽，把我帶到這個七彩的世界去品嚐閱歷世界的多采多姿，在求學期間不斷地給我支持與鼓勵，讓我能無後顧之憂地完成學業。

中華民國一〇八年六月

陳映志

目錄

摘要	
Abstract.....	
第一章 前言	1
1.1 巴氏症	1
1.2 Tafazzin	1
1.3 心磷脂 Cardiolipin (CL)	2
1.4 磷脂絲胺酸 Phosphatidylserine (PS).....	3
1.5 磷脂乙醇胺 Phosphatidylethanolamine (PE)	4
1.6 膽鹼磷脂 Phosphatidylcholine (PC).....	5
1.7 磷脂甘油 Phosphatidylglycerol (PG)	6
1.8 粒線體失能與磷脂質組成之關係	6
1.9 巴氏症對於粒線體 PC、PE 的影響.....	7
1.10 基因治療	7
1.11 磷脂質治療	8
第二章 材料與方法	9
2.1 材料	9
2.2 Megabase-scale CRISPR/Cas9 剔除 TAZ 基因	10
2.3 Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 細胞培養與繼代	10
2.4 放大與純化 pCMV6 質體	11
2.5 pCMV6 質體凝膠電泳	11
2.6 Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 細胞蛋白質定量	11
2.7 萃取細胞脂質	12
2.8 HPLC-ESI -Ion trap -MS 分析粒線體磷脂質	12
2.9 ESI Ion Trap 質譜儀偵測 PS、PE、PC、PG、CL 與 MLCL 之參數設定	13
2.10 細胞內各種類磷脂質計算	13

第三章	TAZ 基因剔除效應	14
3.1	TAZ 基因剔除效應	14
3.2	TAZ 基因剔除與 WT 細胞的 CL 組成差異	15
3.3	TAZ 基因剔除對於 MLCL 組成之差異	16
3.4	TAZ 基因剔除對於 PG 組成之差異	17
3.5	TAZ 基因剔除對於 PC 組成之差異	18
3.6	TAZ 基因剔除對於 PE 組成之差異	19
3.7	TAZ 基因剔除對於 PS 組成之差異	20
3.8	TAZ 基因剔除對於磷脂質調控的影響	21
第四章	基因轉染治療	24
4.1	材料	24
4.2	放大與純化 pCMV6 質體	24
4.3	pCMV6 質體凝膠電泳	24
4.4	Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 基因	25
4.5	Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 西方墨點法	25
4.6	轉染 TAZ 對於巴氏症細胞中磷脂質之改變	27
4.7	轉染 TAZ 對於 CL 組成的改變	28
4.8	轉染 TAZ 對於 MLCL 組成的改變	29
4.9	轉染 TAZ 對於 PG 組成的改變	30
4.10	轉染 TAZ 對於 PC 組成的改變	31
4.11	轉染 TAZ 對於 PE 組成的改變	32
4.12	轉染 TAZ 對於 PS 組成的改變	33
4.13	轉染 TAZ 對於磷脂質合成路徑的改變	34
第五章	脂質治療	36
5.1	材料	36
5.2	Hap1 Δ TAZ 添加 phosphatidylglycerol (18:1) ₂	36

5.3	PG 治療效應.....	37
5.1	添加 PG(18:1) ₂ 對於 CL 的組成影響.....	38
5.2	添加 PG(18:1) ₂ 對於 MLCL 組成差異.....	39
5.3	添加 PG(18:1) ₂ 對於 PG 組成差異.....	40
5.4	添加 PG(18:1) ₂ 對於 PC 組成差異.....	41
5.5	添加 PG(18:1) ₂ 對於 PE 組成差異.....	42
5.6	添加 PG(18:1) ₂ 對於 PS 組成差異.....	43
5.7	添加 PG(18:1) ₂ 對於磷脂質合成路徑的差異.....	44
第六章 結論.....		46
第七章 參考文獻.....		47

圖表目錄

Figure 1、心磷脂結構	3
Figure 2、磷脂絲氨酸結構	4
Figure 3、磷脂乙醇胺結構	5
Figure 4、膽鹼磷脂結構	5
Figure 5、磷脂甘油結構	6
Figure 6、 <i>TAZ</i> 基因剔除與 WT 細胞內磷脂質的總量與相對含量	15
Figure 7、 <i>TAZ</i> 基因剔除與 WT 細胞 CL 組成的差異	16
Figure 8、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於 MLCL 組成之差異圖	17
Figure 9、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於 PG 組成之差異圖	18
Figure 10、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於 PC 組成之差異圖	19
Figure 11、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於 PE 組成之差異圖	20
Figure 12、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於 PS 組成之差異圖	21
Figure 13、 <i>TAZ</i> 基因剔除對於磷脂質合成的影響	22
Figure 14、Hap1 WT 與 Hap1 Δ <i>TAZ</i> 細胞轉染 <i>TAZ</i> 基因前後變化	25
Figure 15、Hap1 Δ <i>TAZ</i> 細胞轉染轉染 <i>TAZ</i> 基因	26
Figure 16、轉染 <i>TAZ</i> 後細胞內磷脂質的總量與相對含量	28
Figure 17、轉染 <i>TAZ</i> 對於 CL 組成的改變	29
Figure 18、轉染 <i>TAZ</i> 對於 MLCL 組成的影響	30
Figure 19、轉染 <i>TAZ</i> 對於 PG 組成的影響	31
Figure 20、轉染 <i>TAZ</i> 對於 PC 組成的影響	32
Figure 21、轉染 <i>TAZ</i> 對於 PE 組成的影響	33
Figure 22、轉染 <i>TAZ</i> 對於 PS 組成的影響	34
Figure 23、轉染 <i>TAZ</i> 對於磷脂質合成路徑的改變	35

Figure 24、Hap1 WT 與 Hap1 ΔTAZ 添加 50 μM PG(18:1) ₂	36
Figure 25、添加 PG(18:1) ₂ 細胞內磷脂質的總量與相對含量	38
Figure 26、添加 PG(18:1) ₂ 對於巴氏症細胞 CL 組成的影響	39
Figure 27、添加 PG(18:1) ₂ 對於 MLCL 組成差異圖	40
Figure 28、添加 PG(18:1) ₂ 對於 PG 組成差異圖	41
Figure 29、添加 PG(18:1) ₂ 對於 PC 組成差異圖	42
Figure 30、添加 PG(18:1) ₂ 對於 PE 組成差異圖	43
Figure 31、添加 PG(18:1) ₂ 對於 PS 組成差異圖	44
Figure 32、添加 PG 對於磷脂質合成的影響	45

摘要

巴氏症(Barth Syndrome)為 X 染色體上 Xq28 位置的 *TAZ* 基因突變使 tafazzin 酵素失去功能，導致粒線體中磷脂調控失衡而導致粒線體損傷。越來越多證據顯示不只有心磷脂的改變會對粒線體造成影響，如巴氏症患者 PE 與 PC 比值會失衡。本實驗使用 Hap1 Δ *TAZ* 細胞作為巴氏症模型，透過逆向層析串聯式質譜儀磷脂質分析平台針對 Hap1 WT、Hap1 Δ *TAZ* 與添加 PG 及轉染 *TAZ* 基因，分析轉染 *TAZ* 與補充 PG 造成的磷脂質改變。結果顯示當轉染 *TAZ* 基因剔除後除 CL 與 MLCL 失衡以外，PC、PE 與 PS 含量與組成皆有改變。Hap1 Δ *TAZ* 轉染 *TAZ* 後使 CL 與 MLCL 比值恢復且組成亦有改變。Hap1 Δ *TAZ* 補充過量的 PG 後，PG 會被分解並被其他磷脂質給吸收，使細胞內特定醯基鏈組成增加。

Abstract

Barth Syndrome is a genetic disease caused by *TAZ* gene mutation at X chromosome Xq28 location. This mutation of tafazzin would lead to the loss of the capacity to regulate mitochondrial phospholipid remodeling and metabolism, causing mitochondria disorder. More and more evidence showed that not only cardiolipin change will cause mitochondria dysfunction, also other phospholipids like PE and PC. This research used a Hap1 Δ *TAZ* cell line as a Barth syndrome disease model, treatment Hap1 Δ *TAZ* cell line was transfected by *TAZ* gene and supplemented PG, and then analyzed the phospholipid compositions by mass spectrometry. The result showed *TAZ* gene knock out cause PC, PE and PS changes. *TAZ* gene transfection recovered cardiolipin and monolysocardiolipin ratio and acyl chain compositions. After supplementation of PG, excess PG will be absorbed by other phospholipid in the cell and cause specific acyl chain species increase.

第一章 前言

1.1 巴氏症

巴氏症(Barth Syndrome)係由 X 染色體上 Xq 28 位置的 *TAZ* 基因突變[1]，使 tafazzin 功能不全而無法將粒線體內的磷脂質進行醯基轉移，導致粒線體心磷質的調控失衡，進而對粒線體的功能造成影響[2]。巴氏症的臨床症狀有骨骼肌病變、心血管病變、代謝異常與嗜中性白血球不足等。骨骼肌方面，會有近側肌肉病變(Proximal myopathy)與運動耐受性不足(Exercise intolerance)。心血管方面，主要有擴張/肥厚型心肌病變[3]及左心室肌致密不全[4]、心內膜彈力纖維增生、心室性心律不整，此類症狀皆會導致心臟衰竭[5]。代謝方面有三甲基戊二酸血症過高(3-Methylglutaconic Aciduria)、骨齡延遲、骨密度不足、生長遲緩及性晚熟。而患者血液中的嗜中性白血球不足，會導致復發性口腔潰瘍、肛週皮炎等感染現象[6]。另外巴氏症患者在發展方面也會有注意力缺乏症候群(Attention Deficit Disorder)或動作發展遲緩等症狀(Delayed Motor Milestones) [7]。目前對於巴氏症並無有效治癒的方式，多採取輔助療法。對於心肌病變，採取用強心劑(Digoxin)增加心臟的血液輸出量、或乙型阻斷劑(beta blockers)減緩心臟收縮，來舒緩心律不整等，藉由藥物刺激來改善心臟功能。

1.2 Tafazzin

Tafazzin 由 292 個胺基酸組成，分子量為 33.5 kDa。N 端前 20 個胺基酸為穿膜區域，以固定於粒線體外膜及內膜。功能為置換磷脂質醯基鏈，將磷脂質轉化成單溶血磷脂質[8]。Tafazzin 蛋白位於胺基酸第 69 號帶正電的 Histidine 與第 74 號帶正電的 Aspartic acid 會與磷脂質結合[9]，將 PC、PE 或 CL 水解其醯基鏈而成 lysoPC、lysoPE 與 monolysocardiolipin(MLCL)，並將取下的醯基鏈，轉移至單溶血型心磷脂 MLCL 上。

Tafazzin 藉由調控磷脂醯基鏈組成，Schlame 等人在 2017 年的研究中，指出 tafazzin 能對 18:2、16:1 與 16:0 的碳鏈進行可逆置換[5]。tafazzin 蛋白在心肌及骨骼肌細胞中會高度表達，研究指出在小鼠缺乏 tafazzin 蛋白作用的情況下，細胞心肌細胞內的單溶血型心磷脂增加，而重塑心磷脂則減少。

1.3 心磷脂 Cardiolipin (CL)

由三個甘油骨架及兩個各帶兩條醯基鏈的磷酸基團所組成(Figure 1)。丙三醇的 1 號及 3 號碳上的氧分別接上一個磷酸基團，而兩個磷酸基團上各別再接上一個甘油骨架，而其甘油骨架的 2 號及 3 號碳上各接上一條醯基鏈。在真核細胞中的 CL 含有較長的醯基鏈，碳數為 16-22 個，且碳鏈中雙鍵數較多，呈現多不飽和態[10]。心磷脂是個帶負電價的雙磷脂質，有學者推測因其兩個磷酸基能在氧化磷酸化過程中捕獲質子。在真核細胞中，大部分的磷脂質都在內質網中生成，但只有心磷脂會在粒線體內膜中被合成出來[11]，並會專一固定於粒線體內膜中[12]。心磷脂會促進粒線體內膜的生成與影響細胞自噬蛋白的功能與活性[13]。另外心磷脂也會參與許多細胞內的電子傳遞鏈、如電子傳遞鏈複合體 II、III、IV (Electron transport chain complex II, III, IV)[14]及 ATP 合成[15]以及粒線體自噬、以清除受損的粒線體[16]。CL 的合成途徑是由磷脂酸 Phosphatidic acid(PA)，經由 CDP-DAG 合成酶將磷脂酸加上 CMP 以合成出 CDP-DAG，再經由 PGPS 將 CDP-DAG 中 CMP 以磷酸基團取代並合成出 Phosphatidylglycero phosphate(PG-P)，接著 PG-P 會於 PGP-P 的作用下脫去一個磷酸基形成 PG。接下來心磷脂合成酶(cardiolipin synthase, CLS)會將 CDP-DAG 上的磷脂質連帶兩條醯基鏈切下與 PG 結合形成新生心磷脂 (nasent CL) [17]。新生心磷脂會經由粒線體中許多酵素調控，如 iPLA2 β 、iPLA2 γ 酵素，會將新生心磷脂水解後形成單溶血型心磷脂(monolysocardiolipin, MLCL)[18]。而醯基轉移酶 tafazzin、lysocardiolipin acyltransferase(ALCAT1)或 Monolysocardiolipin acyltransferase (MLCLAT1)酵素會將心磷脂進行去醯化/再醯化[14]，而生成不同碳鏈組成的重塑心磷脂。心磷脂多出現在粒線體內膜中[19]，少量的心磷脂會因為受

phospholipid scramblase 3 (PLS3)將 CL 從粒線體內膜轉移至粒線體外膜，使細胞開始凋亡[20]。CL 的不飽和醯基鏈能夠使 CL 呈圓錐狀結構以維持粒線體內膜曲率[21, 22]。CL 失衡是巴氏症的指標之一，巴氏症患者因為缺乏 tafazzin 酵素，無法對 CL 進行醯基轉移，造成單溶血心磷脂增加，重塑心磷脂減少[14]，使巴氏症患者心磷脂含量比正常人來的低[23]，同時心磷脂失衡無法造成粒線體功能降低。臨床研究指出，巴氏症患者的肌肉細胞中 CL 含量較正常人低且 MLCL 含量較正常人高[24]，而血小板與淋巴母細胞中 CL 含量也明顯較少[25]。

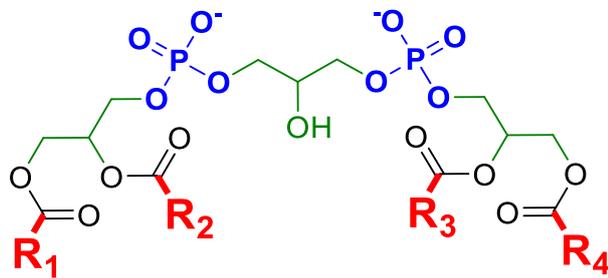


Figure 1、心磷脂結構

心磷脂是由三個丙三醇(綠色)分別連接兩個帶有極性磷酸基團及四條非極性醯基鏈(紅色)，組成兩親性的磷脂質結構。

1.4 磷脂絲胺酸 Phosphatidylserine (PS)

由一個甘油骨架磷酸基接上 serine(Figure 2)。PS 在哺乳類細胞有兩種合成路徑，首先 PS synthase-1 (PSS1)將 PC 上的 choline 置換成 serine 而形成 PC。或是由 PS synthase-2(PSS2)將 PE 的 ethanolamine 置換成 serine 而合成出 PS。PS 也會參與各種生理作用，如血液凝結，會使 PS 從細胞內膜遷移至外膜表面，讓 PS 與凝血酶結合以促進血液凝結，以及外露 PS 的紅血球，也會被巨噬細胞視為清除的對象。且不只 PS，PS 水解產物 lysoPS，若在細胞發炎的情況下，會被 phospholipid scramblase 將 PS 傳遞至細胞膜外，發出凋亡訊號而被巨噬細胞清除[26-29]。

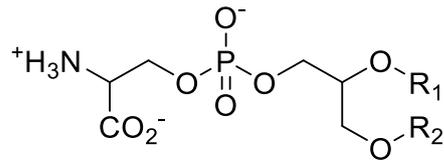


Figure 2、磷脂絲氨酸結構

由帶正電的絲氨酸連接帶負電的磷酸基團，並在磷酸基團接上兩條非極性醯基鏈。

1.5 磷脂乙醇胺 Phosphatidylethanolamine (PE)

PE 是細胞膜中含量僅次於 PC 的磷脂質。由磷脂酸接上 ethanolamine(Figure 3)，有帶有負電的磷酸基與帶有正電四級胺，帶正電的四級胺能與相鄰磷脂質的負電以靜電交互作用力接合。在哺乳細胞中，PE 由兩種路徑合成，首先 CDP-ethanolamine 路徑[30]。Ethanolamine 會被細胞質中的 ethanolamine kinase 磷化酸成 phosphoethanolamine (P-ethanolamine)，接下來會被 phosphoethanolamine cytidylyl transferase 將 P-ethanolamine 轉化成 CDP-ethanolamine，再交由 1,2-diacylglycerol choline/ethanolamine phosphotransferase (CEPT)於內質網中將 CDP-ethanolamine 與 DAG 合成出 PE。或是由粒線體內膜上的 phosphatidylserine decarboxylase (PSD)[31]將 phosphatidylserine 上的 carboxyl group 脫去而形成 PE [32] [33]。因 PE 能夠調整細胞及粒線體膜曲率[34-36]，有學者將 PSD1 及 PSD2 這兩個 PE 合成酶去除，減少明顯減少 PE 的含量[37]，則會對粒線體的型態造成影響[38]。因為 PE 與 CL 有部分功能相同，兩者皆會與粒線體內的酵素作用[39]，並穩定酵素結構的功能[40]。有研究指出若粒線體缺乏 CL 時，PE 能夠代替 CL 來維持粒線體型態[41-43]。當 PE 或 CL 減少時也會影響細胞色素 c 氧化酶的活性[44, 45]。另外哺乳細胞中的 PE 也與細胞分裂有關[46]，同時也會調節高基氏體的膜融合[47]。臨床研究指出巴氏症患者粒線體中的 PE 含量較正常人低，且其中心肌細胞中的 PE 16:0-20:4, 18:0-22:6, 18:0-18:2, 16:0-16:0 與正常人相比就較顯著的差異[25]。

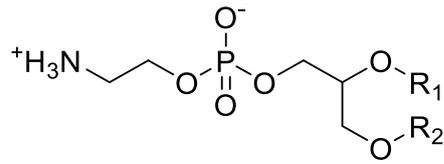


Figure 3、磷脂乙醇胺結構

由一個帶正電的乙醇胺連接帶負電的磷酸基團，並在磷酸基團接上兩條非極性醯基鏈。

1.6 膽鹼磷脂 Phosphatidylcholine (PC)

PC是由一個甘油及一個磷脂磷酸基結合膽鹼(choline)所組成(Figure 4)。PC是粒線體中含量最豐富的磷脂質，結構上帶有負電的磷酸基與帶有正電四級胺能使它能在pH 2-pH 13中維持穩定[48]，在*sn-1*位置為一條飽和醯基鏈，而不飽和醯基鏈則在*sn-2*位置。PC的前驅物為choline，當choline進入細胞後，被cytosolic enzyme choline kinase (CK)磷酸化成phosphocholine (P-choline)，再經由phosphocholine cytidylyltransferase (CT)將P-choline轉化成CDP-choline，CDP-choline會被內質網上的蛋白質轉化成DAG，再由 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase (CPT) 或 1,2-diacylglycerol choline/ethanolamine phosphotransferase (CEPT)將CDP-choline與DAG結餘內質網中合成出PC。磷脂質轉移蛋白(phospholipid transfer protein) Stard7，會專一地將PC轉移至粒線體中[49]。PC也是提供亞油酸(linoleic acid)給tafazzin蛋白已進行心磷脂的再醯化[50]，若細胞缺乏Stard7，使粒線體無法合成PC，會造成粒線體萎縮且使粒線體活性降低[51]。X-ray結晶指出PC中帶正電的胺基、磷酸基或醯基鏈與膜蛋白結合，以穩定蛋白的四級結構。巴氏症患者的心肌細胞中PC 16:0-20:4與PC 16:0-18:2跟正常人PC組成有顯著的差異[25]。

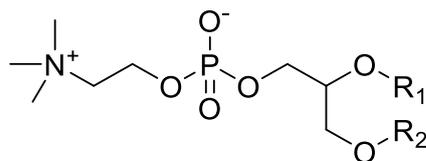


Figure 4、膽鹼磷脂結構

由一個帶正電的膽鹼連接帶負電的磷酸基團，並在磷酸基團接上兩條非極性醯基鏈。

1.7 磷脂甘油 Phosphatidylglycerol (PG)

由 phosphatidic acid 的磷酸基接上 glycerol(Figure 5)。合成 PG 的起始物是 CDP-diacylglycerol 經 diacylglycerol kinase 磷酸化後，形成 phosphatidic acid，再經 CDP-diacylglycerol synthase 形成 CDP-diacylglycerol，再經 phosphatidylglycerophosphate synthase 合成出 phosphatidylglycerol-3-phosphate 後，被 phosphatidylglycerophosphate phosphatase 脫去一個磷酸基合成出 PG。在整顆細胞中，PG 的含量只占了總磷脂質的 1%-10%[52]，且 PG 在 *sn-1* 通常是不飽和醯基鏈，這點與其他磷脂質相異。有學者發現當粒線體缺乏 CL 時，PG 能夠代替 CL 的部分功能，若 PG 不足也會使細胞中呼吸傳遞鏈的降低[53]，而 PG 與也是合成 CL 的前驅物之一[54]。有文獻指出增加 PG，能夠促進 CL 合成[55]且能夠使粒線體內外膜更穩定[56]。

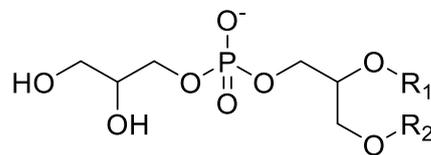


Figure 5、磷脂甘油結構

磷脂甘油由一個丙三醇連接帶負電的磷酸基團，並在磷酸基團接上兩條非極性醯基鏈。

1.8 粒線體失能與磷脂質組成之關係

在哺乳細胞中，粒線體內會由許多蛋白複合物經由養化磷酸化過程而產生 ATP，而粒線體的功能是否正常，其磷脂質組成就成了相當重要的指標，各項磷脂質會促進細胞

內各項反應，如：程序性凋亡、細胞自噬及影響粒線體融合。外膜由 PC: 54%、PE:29%、及 PI:14%所組成，內模由 PC 及 PE 佔了 75%，剩下的 15%-20%則是 CL。粒線體失能會造成心血管疾病、代謝症候群、糖尿病、神經退化[17][26]以及癌症。在粒線體中，若 PE 減少 20%，PC/PE 比值增加時，對細胞生長與功能造成了嚴重的負面影響[57]，且粒線體中的 ATP 數量也明顯下降；若粒線體內 PE 減少 30%，則會嚴重影響其功能。PG 能活化 protein kinase C 的，使細胞進行 G2 phase 有絲分裂[58]，而 PG 失衡會導致糖尿病[59]。

1.9 巴氏症對於粒線體 PC、PE 的影響

巴氏症患者與正常人的心肌細胞中的 PC 與 PE 的組成有異。在 PC 方面，正常人 PC 16:0-PC 24:4 的 PC 佔了總磷脂質約 20%，而巴氏症患者卻相當稀少，在 PC16:0-18:2 方面正常人約為 20%，患者則為 40%。PE 方面，PE 16:0-24:4、PE 18:0-22:6、PE 18:0-20:4 這些種類的 PE 則高於巴氏症患者，而 16:0-18:2、18:0-18:2、16:0 的 PE 則是低於巴氏症患者。若骨骼肌中的 PC/PE 失衡，會擾亂肌肉細胞的鈣離子動態平衡，而影響骨骼肌對於胰島素的敏感度。但磷脂質如何影響胰島素作用，實際的機制目前尚未明瞭。而在肝細胞中，PC 與 PE 的比值介於 1.5-2.0 間，若 PC/PE 大於 2.0，肝臟方面會出現非酒精性脂肪肝，小於 1.0 則會肝衰竭。而 PC/PE 大於 2 會罹患非酒精性脂肪肝，PC/PE 小於 1 則會造成肝衰竭[60]。

1.10 基因治療

為了解決先天性遺傳疾病，科學家們透過植入酵素或基因來解決問題。雖然酵素取代療法為最快速有效的方式，但礙於成本高難以實行。而基因轉染療法能只需要轉染少量細胞，以溶酶體為例，經過基因轉染的細胞能藉由(cross-correction mechanisms)去調控

遠處的未受轉染的細胞[61]。有學者將 androgen receptor (AR/Ar)基因轉染至細胞中，並成功使細胞表達 AR 蛋白並調節雄性激素。亦有科學家針對 lysocardiolipic acyltransferase 失活會導致肺纖維化[62]的法布瑞氏症(Fabry disease) IMFE1 細胞進行轉染治療，並試圖修復 Xq22 位置上的 GLA 基因，並提高了 α -galactosidase A 水解 α -galactose 的效率[63]。

1.11 磷脂質治療

不僅於從基因方面著手，科學家們也有使用磷脂質進行治療的先例。給予阿茲海默症患者服用PS，並改善了患者的認知能力與短期記憶功能[64] [65]。2008年，Pandey等人變用PI針對心血關疾病患者進行投藥，並增加了血漿中的高密度脂蛋白[66]，或每日攝取各類磷脂質[67]，上述都是以磷脂質作為治療方式臨床先例。亦有團隊試著使用磷脂治療粒線體，使TLR-4-specificAgonist活化的RAW246.7細胞株中心磷脂增加並使粒線體活性恢復[68]。以及使用心磷脂質體與MTO化療藥物結合降低藥物本身的毒性[69]。

第二章材料與方法

2.1 材料

Megabase-scale CRISPR/Cas9 knockout *TAZ* HAP1 cell line，購買自 Horizon Discovery(UK)。Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 與 Fetal Bovine Serum(FBS)、Penicillin-Streptomycin(PS)，Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 及 trypsin 皆購買自 Invitrogen(St.Louis, MO)。RIPA Buffer 細胞裂解液及 Kanamycin sulfate from *Streptomyces kanamyceticus* 購買自 Sigma (St Louis, USA)。Nuclease-free water、Agarose-molecular biology grade 購買自 Invitrogen(St.Louis MO)。DH5 α competent cell 購買自 Yeastern Biotech(Taiwan, R.O.C.)。AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 購買自 CORNING(New York, USA)。Health view nucleic acid stain 購買自 PROtech (Taiwan, R.O.C.)。DNA Ladder 購自 Biokit (barcelona, spain)。SmartView Pro 1100 購買自 Majorscience (Taiwan, R.O.C.)。Triton X-100 購買自 OmniPur (St Louis, USA)。Bradford protein binding assay 與 SYBR Green system Super Mix，購買自 BioRad (Montreal, Canada)。Coomassie Brilliant Blue G—250，購買自 BIO-RAD (Hercules, CA)。Tetra-myristoyl cardiolipin CL(14:0)₄ 心磷脂標準品購買於 Avanti (Alabaster AL, USA)。Mitochondria isolation kit for mammalian cells 購買自 Thermo scientific(Ottawa, ON, Canada)。BeckmanCoulter Allegra X-30R Centrifuge(CA, USA)。Prestained protein marker 購買自 Biokit (Tepnel, Manchester, UK)。5X Protein Sample Buffer 購買自 GeneMark(Taiwan, R.O.C.)。Bovine serum albumin Fatty acid-free 購買自 AKRON(Ohio, USA)。Anti-DDK antibody 購買於 Novus (Littleton, CO)。AntiRat antibody 購買於 Jackson Immuno Research(West Grove, PA)。Alkaline phosphatase、BCIP、NBT 與 formic acid 購買於 Sigma-Aldrich(St Louis, USA)。iScript cDNA Synthesis Kit 購買於 BIO-RAD(Hercules, CA)。T-PC SYBR Green system Super Mix 購買於 BIO-RAD (Hercules,

CA)。DNA 模板購買於 ZGene Biotech Inc。Nanovue 購買自 GE Healthcare。Acetonitrile、Isopropanol 購買自 J.T.baker。Acclaim RSLC 120 C18 2.1 mm × 100 mm 2.2 μm column 購買自 Thermo(Ottawa, ON, Canada)。

2.2 Megabase-scale CRISPR/Cas9 剔除 TAZ 基因

使用 Megabase-scale CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins)將 Hap1 細胞中製造 tafazzin 的基因 *TAZ* 進行剔除。設計一段 23nt single guide RNA (sgRNA)接上另一 100+nt scaffolding part，使 plasmid 其能轉錄出 single guide RNA (sgRNA)。Cas9 核酸內切酶會與 sgRNA 形成 Cas9 複合體，sgRNA 會帶著 Cas9 複合體辨識宿主細胞中 Tafazzin DNA 序列中的 PAM (Protospacer adjacent motif)，再由 sgRNA 將雙股 DNA 解旋並鍵結上特定 DNA 序列，這時 Cas9 會將雙股 DNA 截斷，細胞會為了修復被截斷的部分，而使用非同源末端連接片段來修復 DNA，而使該基因片段失效。經由抗生素篩選後，使用 PCR 做 RNA 定序基因表達 (RNA sequencing)，做全基因組測序 (Whole-genome sequencing)來確定細胞中突變 *TAZ* 基因，培養出 *TAZ* knockout Hap1 細胞株(Hap1 Δ TAZ)，作為本研究使用的初代細胞模型 (委託 Horizon Discovery，UK 製作)。

2.3 Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 細胞培養與繼代

本實驗使用的細胞株為 Hap1 WT 與以 Megabase-scale CRISPR/Cas9 將 *TAZ* 基因剔除的 Hap1 Δ TAZ 細胞。使用以 90% DMEM、10% FBS、0.5% PS 調合的細胞培養液，培養於 37 °C、5% 二氧化碳的環境中。繼代細胞則使用 PBS 內含 1 mM EDTA，洗去雜質後，用胰蛋白酶(trypsin)，切斷細胞與培養皿間的胜肽鍵，使細胞懸浮後以等體積的培

養液終止 trypsin 反應，再以 3000 xg 離心分鐘收集細胞去除上清液，再以培養液沖散細胞移至培養皿上進行繼代。

2.4 放大與純化 pCMV6 質體

將 2 g 的 LB broth 與 1.5 g Agar 與 100 mL DDW 混勻並滅菌，並加入 kanamycin(最終濃度 25 µg/mL)，至 9-cm dish, 凝結後置於 4 °C 保存。將 1 µg 的 pCMV6 Entry TAZ Myc-DDK-tagged 以 Heat-shock 方式使 DH5α 勝任細胞攝入質體後，將 DH5α 塗於瓊脂膠盤上於 37 °C 培養 16 小時，挑出菌落並放入含有 kanamycin(25 µg/mL)的 LB 於 37 °C 培養 16 小時，以 3000 xg 離心 8 分鐘去除上清液，使用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 純化質體。以 Nanovue 定量核酸濃度。

2.5 pCMV6 質體凝膠電泳

以 50X TAE buffer 混合 DDW 調合成 1 % Agarose 及 Health view nucleic acid stain 進行內染，加入核酸標準液，以 100 伏特 30 分鐘於 TAE buffer 中分離質體。使用 SmartView Pro 1100 進行顯影。

2.6 Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 細胞蛋白質定量

細胞以 Bradford protein-binding assay 來進行蛋白質定量。利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 與胺基酸中的 Arg、Phe、Try、Pro 鍵結，以 595 nm 去測吸收度以得蛋白濃度。首先將細胞收起後，以 1 mL PBS 沖散細胞兩次，取 100 µL 以 3000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液收集細胞，加入 100 µL 0.1% Triton X-100 並混勻，於超音波水浴槽震盪 5 分鐘，再以 10000 xg 離心 2 分鐘，保留上清液，並製備 Coomassie Brilliant Blue G-250 與 DDW 以 1:4 的比例混合並與 BSA 製作標準檢量曲線，使用微盤分析儀(SpectraMax

M Series Multi-Mode Microplate Readers)進行蛋白質定量。

2.7 萃取細胞脂質

收起添加 PG 與轉染 *TAZ* 基因的細胞。使用 Mitochondria isolation kit，並以 Bligh Dyer[70] 萃取粒線體中的脂質，先以含有 1% 甲酸的甲醇回溶樣品並加入脂質標準品 CL(14:0)₄ (250 ng)、PS(14:0)₂ (250 ng)、PG(14:0)₂ (250 ng)、PE(14:0)₂ (125 ng)、PC(14:0)₂ (250 ng)，並以體積 1:1 比例與二氯甲烷混合均勻，分層後取下層有機相中的脂質樣品，以氮氣吹乾後以 400 μ L 90% 異丙醇、10% 乙腈、1% 甲酸與 10 mM Ammonium formate 回溶。

2.8 HPLC-ESI -Ion trap -MS 分析粒線體磷脂質

HPCL 移動相分為水相 A:60%乙腈、40% DDW、1%甲酸與 10 mM Ammonium formate 與有機相 B:90%異丙醇、10%乙腈、1%甲酸與 10 mM Ammonium formate。移動相梯度比例前五分鐘為 A:45% B:55%，而 B 隨著時間上升而增加:5 分鐘至 15 分鐘 B:60%，15-25 分鐘 B:上升至 65%，25-35 分鐘 B:75%，35-60 分鐘 B:100%，60-65 分鐘 B 降 55%，65-90 分鐘維持 A:45%；B:55%清洗並平衡管柱。分離管柱為 Acclaim RSLC 120 C18 2.1 mm \times 100 mm 2.2 μ m column，管柱溫度為 55 $^{\circ}$ C，流速 0.2 mL/min 進行分析。使用 Bruker DataAnalysis(ver.4.1) 與 Bruker Quan Analysis 進行數據處理，並取質量訊號之 EIC(Extracted ion chromatogram)面積來對數據進行半定量分析。分析粒線體磷脂質條件: 前 25 分鐘使用負電偵測並以質譜多反應監測(MRM)分析由不同碳鏈組成 PG 所裂解出之脂肪酸(fatty acid)進行定量。

2.9 ESI Ion Trap 質譜儀偵測 PS、PE、PC、PG、CL 與 MLCL 之參數設定

以正電及負電交錯偵測，霧化壓力為 25 psi，並以每分鐘 8 公升 325 °C 的氮氣進行乾燥，偵測質量範圍 0-42 分鐘為 500-1250 m/z ；42-60 分鐘為 1000-1550 m/z 。

2.10 細胞內各種類磷脂質計算

計算各項實驗條件的粒線體中磷脂質的總量，細胞中 PS、PE、PC、PGCL 與 MLCL 的半定量計算公式如下：

細胞內磷脂質計算

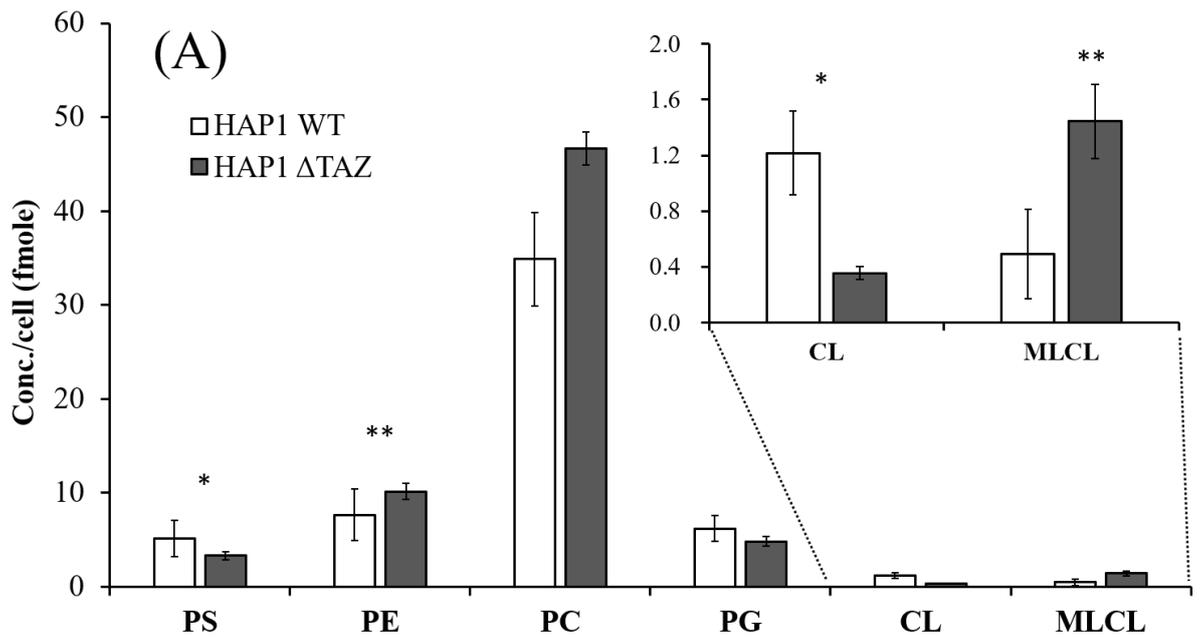
每顆細胞中各項磷脂質總量(fmole)=

$$\frac{\text{各種磷脂質的 EIC 積分面積總和}}{\text{內標準品 EIC 積分面積}} \times \frac{\text{內標準品含量}}{\text{細胞數(fmole)}}$$

第三章 TAZ 基因剔除效應

3.1 TAZ 基因剔除效應

將細胞中的 *TAZ* 基因剔除使 tafazzin 失去功能後，首先可以看見 CL 的濃度減少 (Figure 6A)70.67% 同時也造成 MLCL 濃度增加 292%，CL 與 MLCL 的比值從 WT 的 2.47 降到了 0.25。由於 Tafazzin 失去活性後無法將 PC 作為受質，使 PC 的醯基鏈無法透過 Tafazzin 轉移至 MLCL 上及調節 CL 的醯基鏈，造成 PC 堆積而濃度上升 134%。除此之外，我們也觀察到 PE 濃度上升了 32%，以及 PS 濃度下降 36.7%。



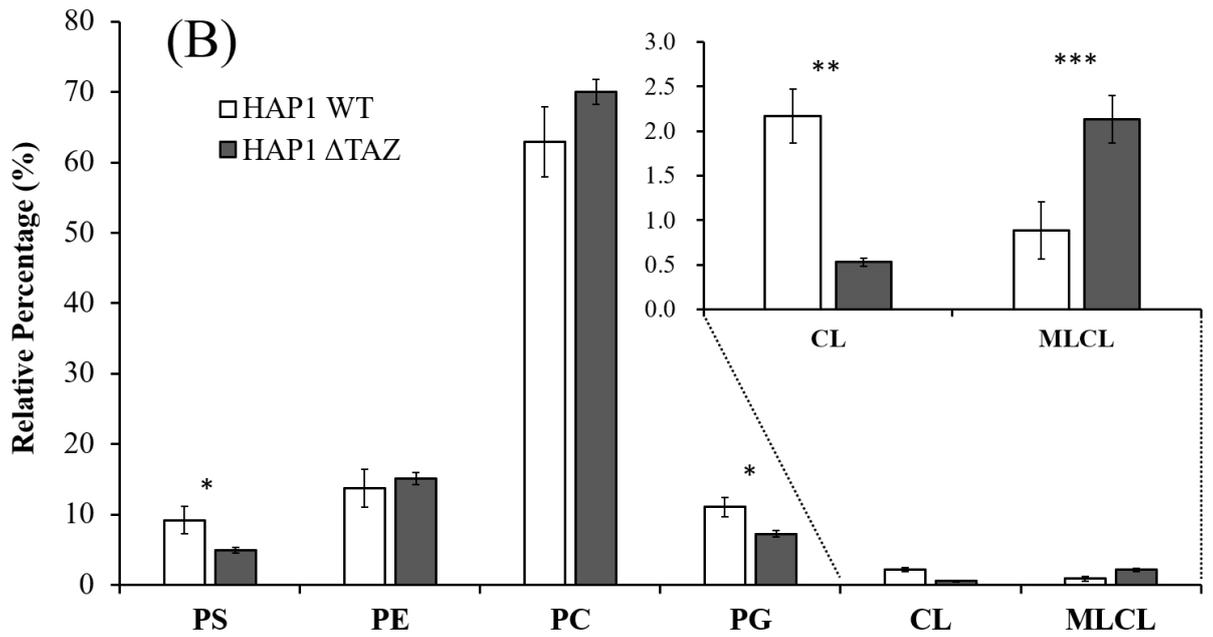


Figure 6、TAZ 基因剔除與 WT 細胞內磷脂質的總量與相對含量

(A)各磷脂質在 Hap1 與巴氏症細胞中的總量，右上角的窗格為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質於每顆細胞內的濃度、橫軸為磷脂質的種類。(B)各磷脂質在 HAP1 與巴氏症每顆細胞中的相對含量，右上為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對含量，橫軸為磷脂質的種類，每種細胞的磷脂質總合為 100%。PS:phosphatidylserine；PE:phosphatidylethanolamine；PC:phosphatidylcholine；PG:phosphatidylglycerol；CL:cardiolipin；MLCL:monolysocardiolipin。用液相層析串聯式質譜得出內標準品面積，再將生物生物樣品面積除以內標準品面積而得出樣品濃度計算而得到細胞磷脂質濃度。白色:Hap1 WT；灰色:Hap1 ΔTAZ。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

3.2 TAZ 基因剔除與 WT 細胞的 CL 組成差異

在 TAZ 基因剔除之後，CL 的主要五個群落(Figure 7)分別是 CL(66)、CL(68)、CL(70)、CL(72)與 CL(74)，這五個群落的雙鍵數全面下降，整體的 CL 性質趨向新生 CL。此現象說明新合成的 CL，因為 Tafazzin 失去功能，會無法將含有較多雙鍵的醯基鏈轉移至 CL 上而成為成熟的 CL。

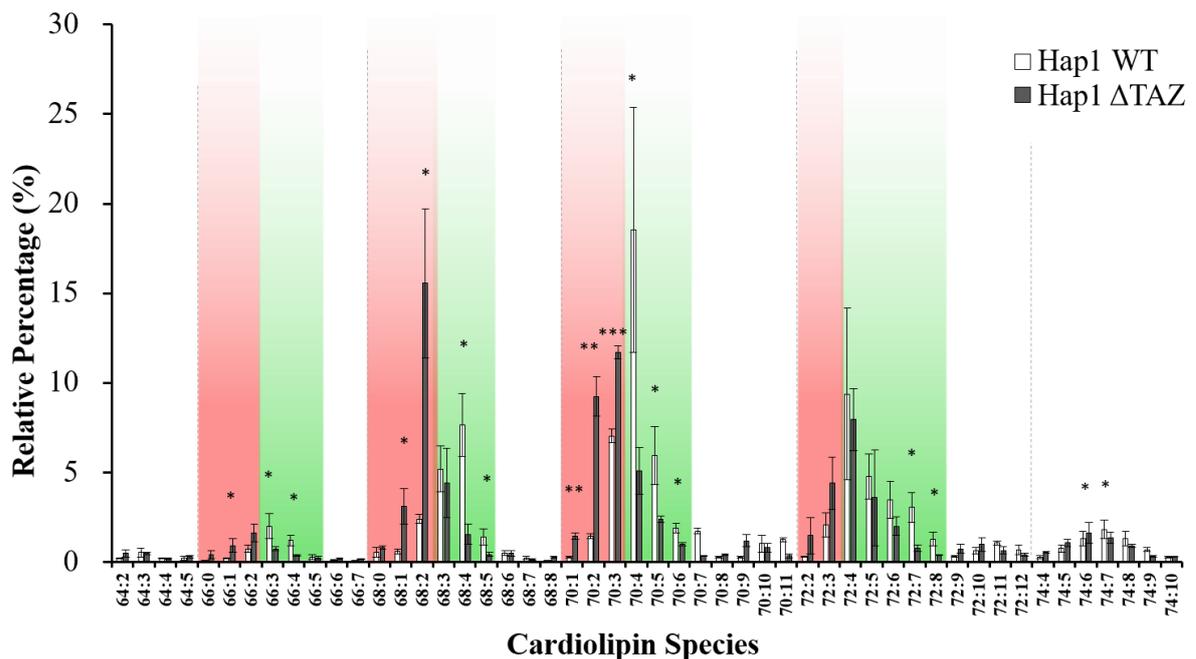


Figure 7、TAZ 基因剔除與 WT 細胞 CL 組成的差異

圖為 CL 在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 CL 的組成種類，每種細胞的 CL 總合為 100%。紅色為 TAZ 基因剔除細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

3.3 TAZ 基因剔除對於 MLCL 組成之差異

將 TAZ 基因剔除後因缺少了 tafazzin 調節 MLCL 而 MLCL 的總量上升，且其中的醯基鏈組成也有變化(Figure 8)，短碳鏈與長碳鏈的 MLCL(50)、MLCL(56)比率減少，MLCL(52)、MLCL(54)比率相對增加，係因 PLA₂ 傾向水解長度較不適合的醯基鏈，以便 tafazzin 進行醯基鏈轉移後能直接轉化成成熟 CL，所以當 tafazzin 失去功能無法將較適合的醯基鏈轉移 CL 成為成熟 CL，而新生 CL 被 PLA₂ 水解較不適合的醯基鏈，而使短碳鏈與長碳鏈的 MLCL 減少，中碳鏈 MLCL 就會相對增加。

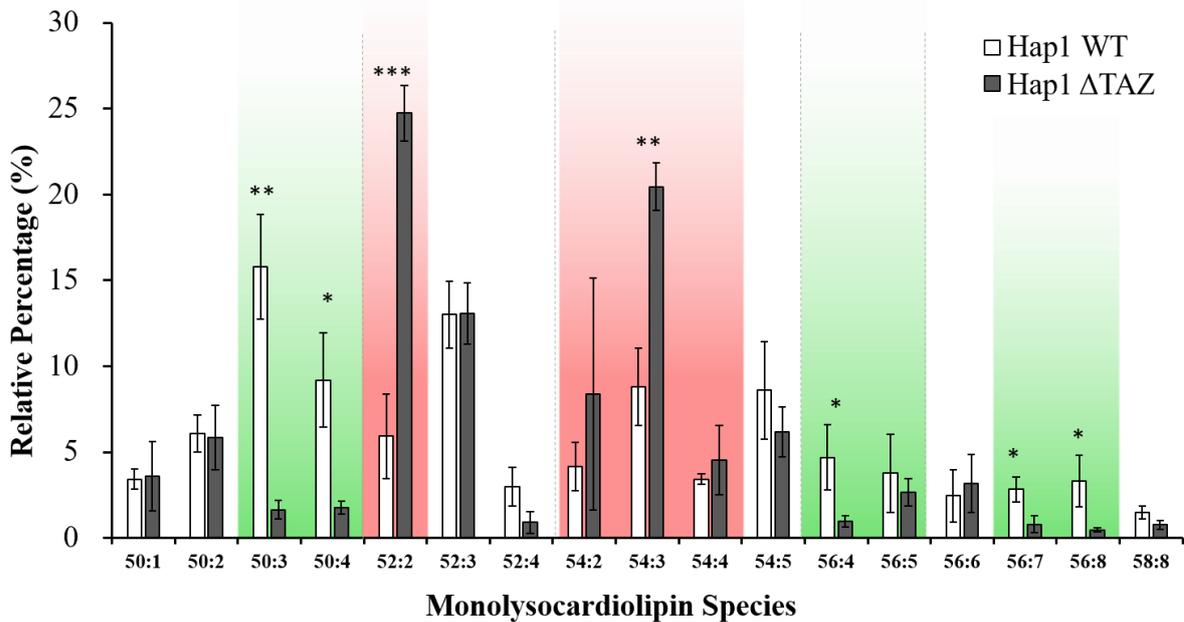


Figure 8、TAZ 基因剔除對於 MLCL 組成之差異圖

圖為 MLCL 在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 MLCL 的組成種類，每種細胞的 MLCL 總合為 100%。紅色為巴氏症細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3.4 TAZ 基因剔除對於 PG 組成之差異

基因剔除後，雖然 CL 總量下降，但作為 CL 前驅物的 PG 總量卻不受影響(Figure 6A)。可以看見不論是 Hap1 WT 或是 TAZ 基因剔除細胞株，PG 主要都是由 PG (34:1)、PG (36:0)與 PG(38:0)所組成。除了 PG(34:1)減少了 15%外，其餘 PG 的種類改變皆小於 10% (Figure 9)，說明 tafazzin 酵素失去功能並不會影響到 PG 的組成與生成。

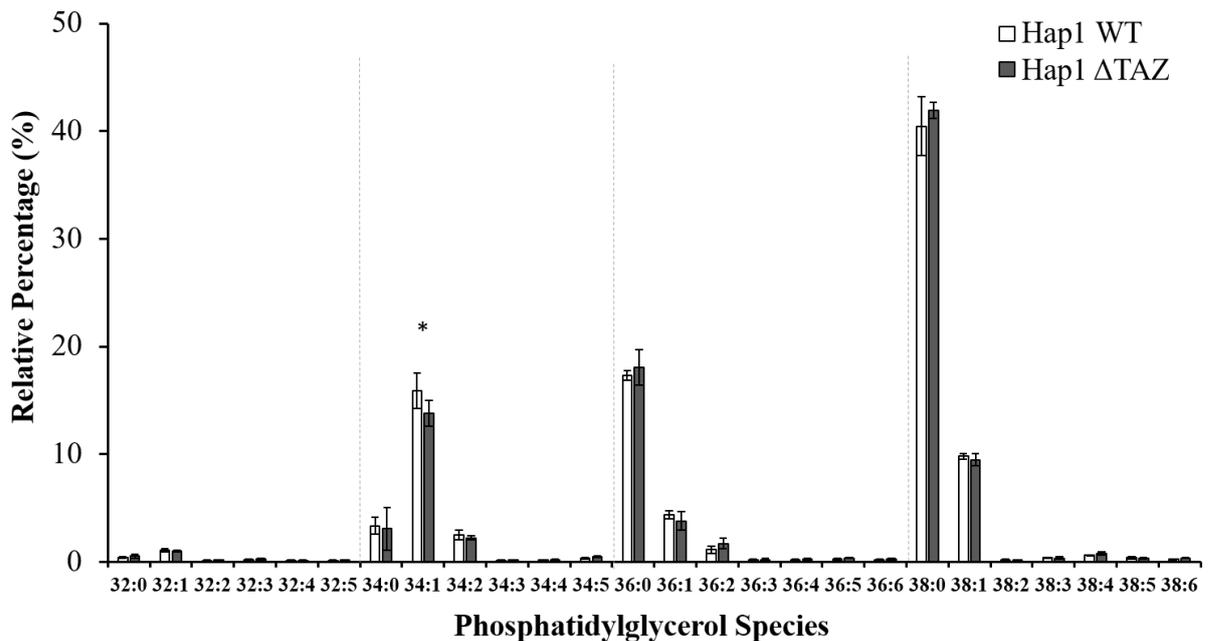


Figure 9、TAZ 基因剔除對於 PG 組成之差異圖

圖為各 PG 在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PG 的組成種類，每種細胞的 PG 總合為 100%。紅色為巴氏症細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3.5 TAZ 基因剔除對於 PC 組成之差異

將 TAZ 基因剔除後，因缺乏 tafazzin 將 PC 作為受質，tafazzin 無法帶有較多雙鍵數的不飽和醯基鏈從 PC 取下，導致 PC 的總量(Figure 6A)及雙鍵數增加(Figure 10)。其中 PC(34:1)的變化最為明顯，因為 PC(34:1)是由兩條碳長分別為 16 與 18 的醯基鏈所組成，而 tafazzin 傾向於水解碳長為 16 與 18 之醯基鏈，在 tafazzin 失活的情況下使帶有 18 個碳長的 PC 免於被水解，造成 PC(34:1)含量較 Hap1 WT 上升 20.7%，而 PC(34:2)與 PC(36:1)皆微幅下降。

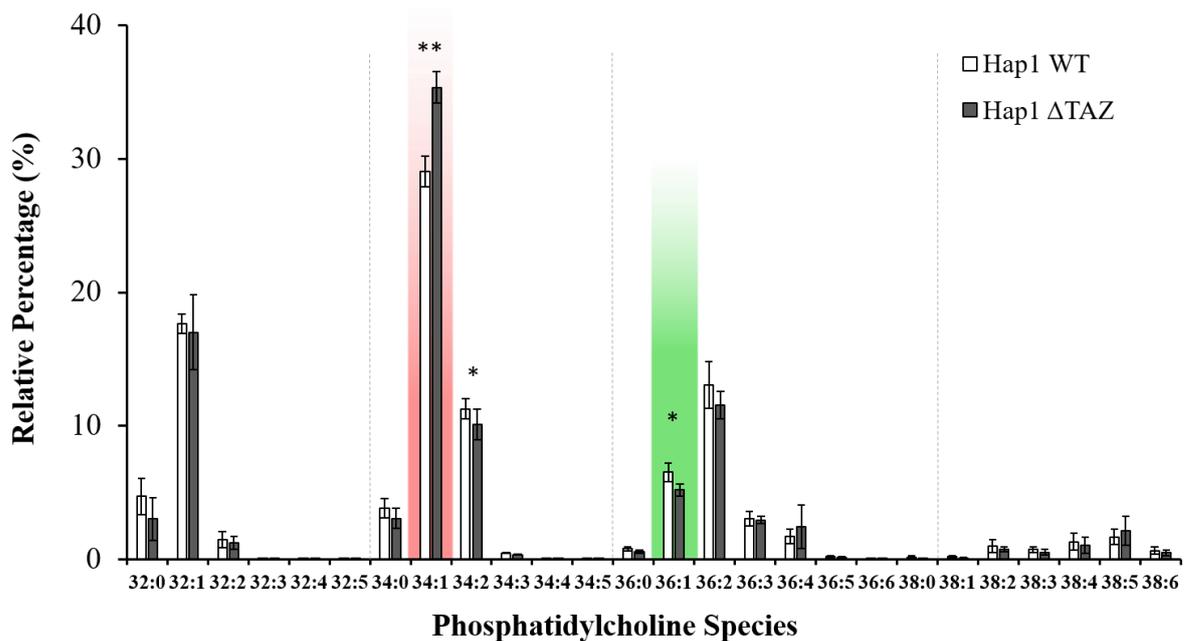


Figure 10、TAZ 基因剔除對於 PC 組成之差異圖

圖為 PC 在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PC 的組成種類，每種細胞的 PC 總合為 100%。紅色為巴氏症細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3.6 TAZ 基因剔除對於 PE 組成之差異

TAZ 基因剔除後，因 tafazzin 失去功能而無法將 PC 作為受質使 PC 堆積，而過多的 PC 可能抑制了 phosphatylethanolamine methyltransferase(PEMT)將 PE 轉化成 PC，卻沒抑制上游合成 PE 的 phosphatylserine decarboxylase(PSD)，使 PE 過剩(Figure 7A)而造成 PE 在細胞中的濃度上升。雖然 PE 在細胞中的濃度上升，但主要組成 PE(34)與 PE(36)組(Figure 11)並沒有明顯改變。Hap1 WT 與 TAZ 基因剔除其 PE 各別組成改變量皆小於 10%，故 PE 組成幾乎沒有變化。

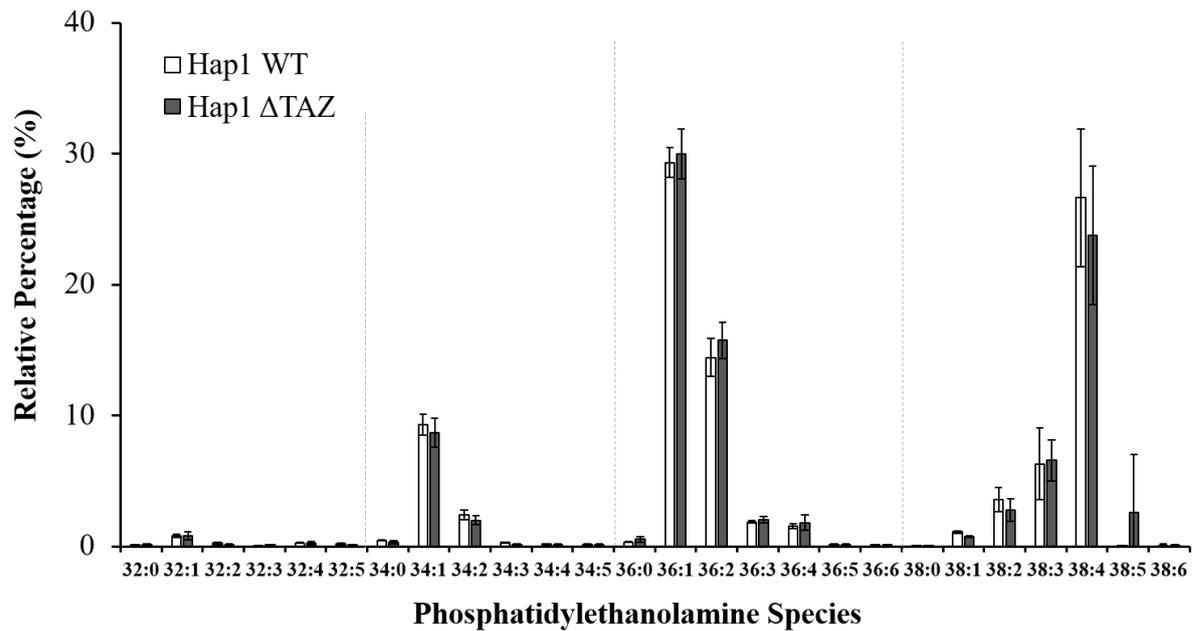


Figure 11、TAZ 基因剔除對於 PE 組成之差異圖

圖為 PE 在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PE 的組成種類，每種細胞的 PE 總合為 100%。紅色為巴氏症細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

3.7 TAZ 基因剔除對於 PS 組成之差異

TAZ 基因剔除後，PS 主要皆由 PS(34)、PS(36)與 PS(38)所組成，雖然 PS 濃度減少 (Figure 6A)，但 PS 醯基鏈中的雙鍵數增加(Figure 12)，PS(36:0)減少了 33%，而 PS(36:1)與 PS(38:2)各別增加 15%與 52.6%。

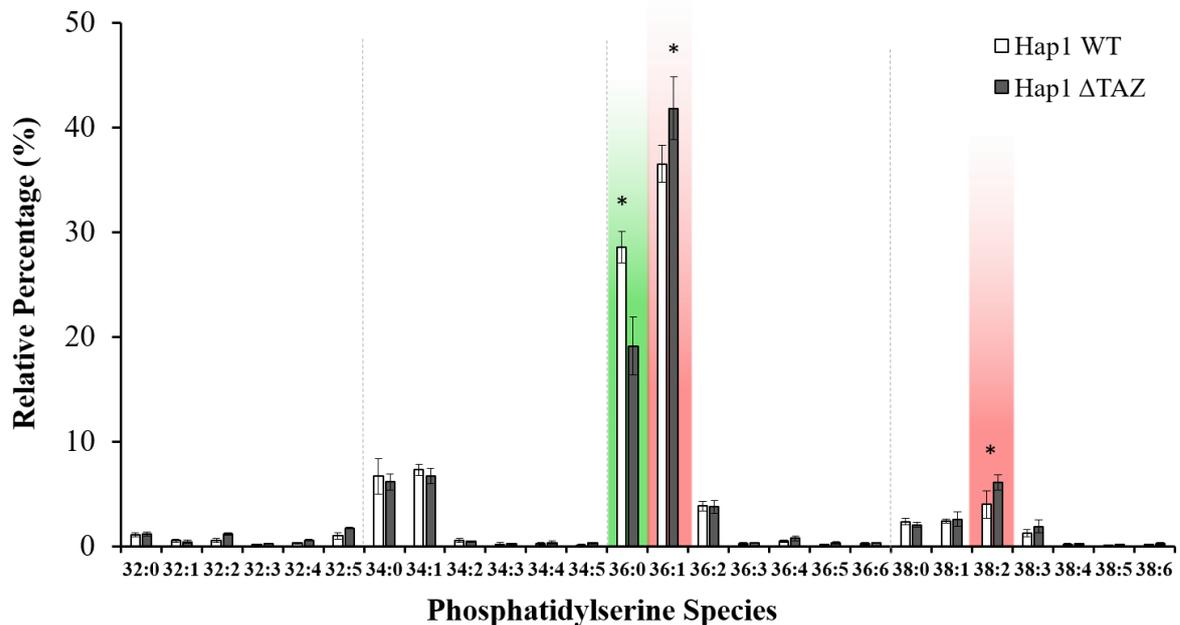


Figure 12、TAZ 基因剔除對於 PS 組成之差異圖

圖為各磷脂質在 WT 與 TAZ 基因剔除細胞中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PS 的組成種類，每種細胞的 PS 總合為 100%。紅色為巴氏症細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

3.8 TAZ 基因剔除對於磷脂質調控的影響

在 Tafazzin 失去功能後(Figure 13)，會無法對 CL 進行醯基鏈的調控，CL 雙鍵數減少，這代表新合成 CL 因為 TAZ 被剔除，而無法修改醯基鏈以趨成熟，因而造成雙鍵減少，整體 CL 的組成趨向新生 CL。然而新合成之 CL，因其醯基鏈較符合生物體所需，導致 PLA₂ 不斷的水解新生 CL，加上 CL 合成酶的基因表達受到抑制，使其濃度下降，同時造成 MLCL 不斷生成，而這也形成 CL 與 MLCL 的比值失衡。另一個 MLCL 累積的原因是 MLCL 無法透過 tafazzin 進行醯基鏈轉移將 MLCL 轉化成 CL，理論上此工作應可由 ALCAT 與 MLCLAT-1 醯基轉移功能替代，但效率似乎不高。而過去 RT-qPCR 實驗指出 TAZ 剔除造成 iPLA₂ β 及 iPLA₂ γ 的基因表達增強，此實驗也間接證實在此條件

下，ALCAT 並不會因此提高活性或數量以消除過多之 MLCL，而且反而是抑制基因表達的行為。加上由於 tafazzin 已經失去功能，無法在從 PC 取走不飽和醯基使 PC 無法被消耗而導致濃度升高且雙鍵數增加。PG 為製造 CL 的上游物質，下游之醯基重組並不影響 PG，因此其醯基鏈無明顯改變，而其含量減少，可能為 CL 需求增加之故，或受 PG 合成酶表達抑制的影響，但合成之 CL 隨後亦皆被 PLA₂ 水解。

雖然 PE 的濃度如 PC 一樣上升，但是其雙鍵數變化不明顯，因此較不可能受到 CL 重組阻斷之影響，也因此推論 PE 並非主要提供 CL 重組的磷脂質，同時也證實 PC 才是主要提供 CL 重組的磷脂質。此外，推估 PE 濃度升高有兩種可能，第一可能為 PEMT 被抑制，因 PC 是由 PE 透過 phosphatidylethanolamine methyltransferase (PEMT) 或 CDP-choline 轉化而成，所以若 PC 堆積，可能會抑制 PEMT 阻止 PE 繼續轉化成 PC，而 PEMT 被抑制後使 PE 堆積濃度上升，組成不變。第二可能是 CDP-ethanolamin 轉化成 PE 的，最後 PS 濃度下降且雙鍵數增加，造成此現象的原因推測是合成 PS 的 PSS1 與 PSS2 被抑制，但 PS 轉化成 PE 的 PSD 卻沒有被抑制，所以才導致 PE 濃度升高但 PS 濃度卻降低。

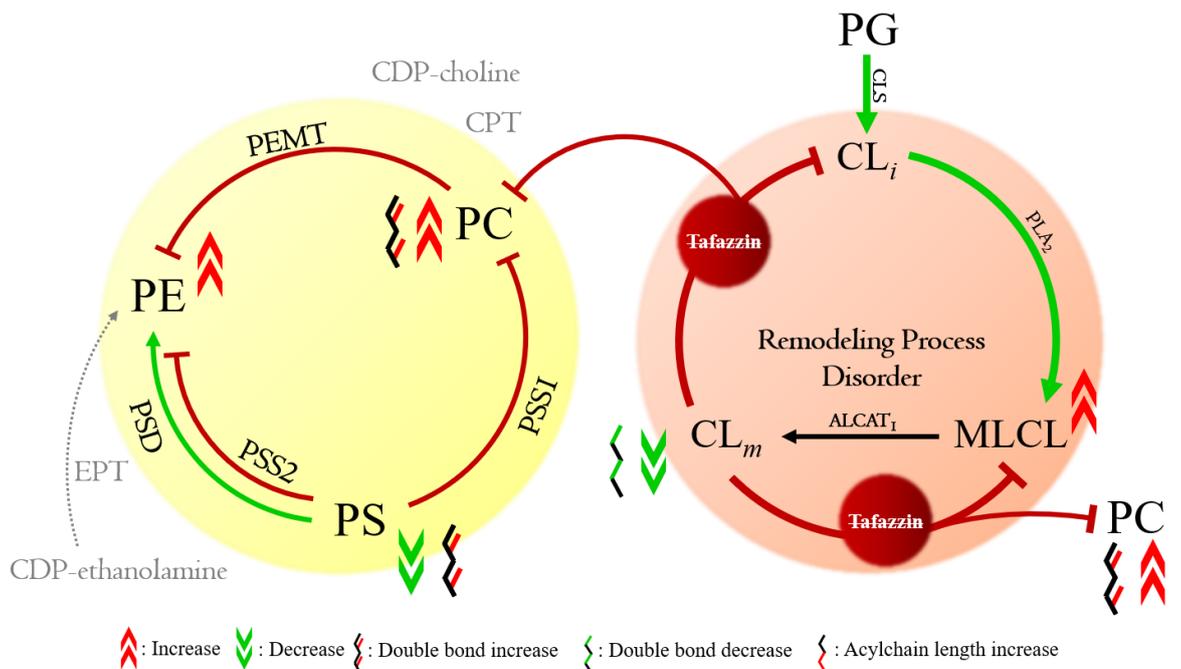


Figure 13、TAZ 基因剔除對於磷脂質合成的影響

圖為 CL 與其他磷脂質的合成圖，右邊為 CL 重塑機制，左邊為 PC、PE、PS 的合成機制。綠色箭頭為不受基因剔除影響的路徑，紅色路徑為受基因剔除影響路徑。綠色向下雙箭頭為含量下降，紅色向上雙箭頭為含量上升，碳鏈上的雙鍵紅標為雙鍵數上升、灰標為碳長變短、單鍵綠標為雙鍵數減少。

第四章 基因轉染治療

4.1 材料

lipofectamine 3000 Reagent 購買自 Thermo Fisher Scientific (MA USA)。pCMV6 Entry TAZ Myc-DDK-tagged 購買自 Origene (Rockville, MD)。

4.2 放大與純化 pCMV6 質體

將 2 g 的 LB broth 與 1.5 g Agar 與 100 mL DDW 混勻並滅菌，並加入 kanamycin(最終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，至 9-cm dish，凝結後置於 4 °C 保存。將 1 μg 的 pCMV6 Entry TAZ Myc-DDK-tagged 以 Heat-shock 方式 使 DH5 α 勝任細胞攝入質體後，將 DH5 α 塗於瓊脂膠盤上於 37 °C 培養 16 小時，挑出菌落並放入含有 kanamycin(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 於 37 °C 培養 16 小時，以 3000 xg 離心 8 分鐘去除上清液，使用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 純化質體。以 Nanovue 定量核酸濃度。

4.3 pCMV6 質體凝膠電泳

以 50x TAE buffer 混合 DDW 調合成 1 % Agarose 及 Health view nucleic acid stain 進行內染，加入核酸標準液，以 100 伏特通電 30 分鐘於 TAE buffer 中分離質體。使用 SmartView Pro 1100 進行顯影。

4.4 Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 基因

將 Hap1 Δ TAZ 置於培養箱一天並貼盤後，使用 lipofectamine 3000 Reagent 與 5 μ g 的 pCMV6 Entry TAZ Myc-DDK-tagged 加入 DMEM 中靜置 20 分鐘後，加入貼盤的細胞中於 37 °C、5 %二氧化碳培養 48 小時(Figure 14)。

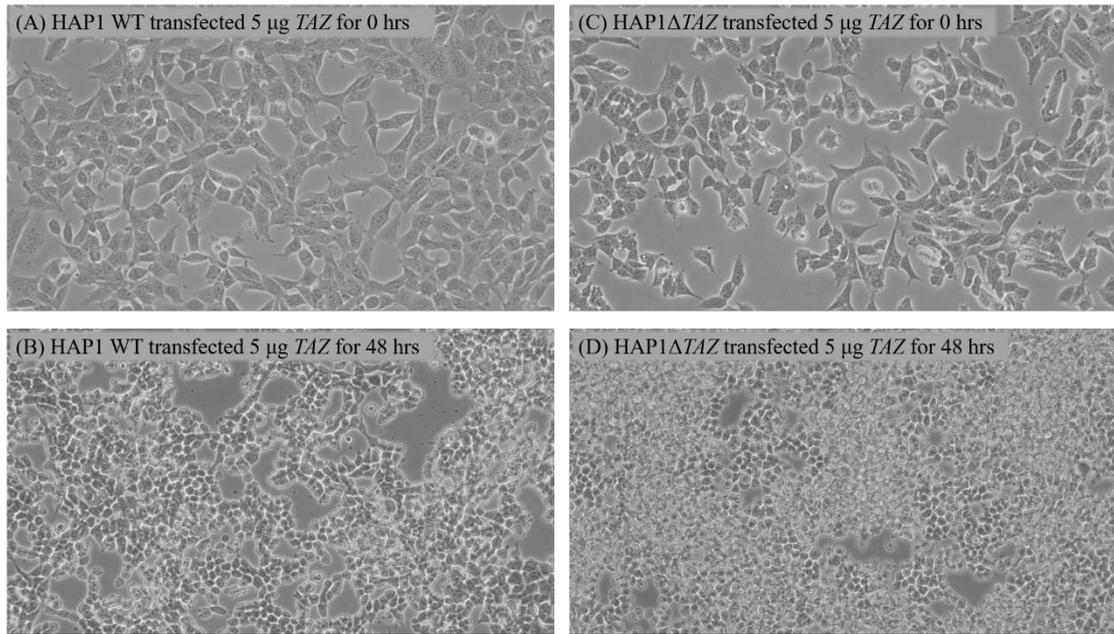


Figure 14、Hap1 WT 與 Hap1 Δ TAZ 細胞轉染 TAZ 基因前後變化

圖為 Hap1 WT 與 Hap1 Δ TAZ 顯微鏡觀測圖。(A) Hap1 WT 轉染 TAZ 0 小時。(B) Hap1 WT 轉染 TAZ 48 小時。(C) Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 0 小時。(D) Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 48 小時。

4.5 Hap1 WT 及 Hap1 Δ TAZ 西方墨點法

以 1 mL PBS 沖散細胞兩次，取 900 μ L 以 3000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，加入 100 μ L RIPA buffer，靜置於冰上 15 分鐘後，用超音波粉碎機(Qsonica Sonicators)以功率 80% 於冰上震盪 20 秒後，12000 xg 離心 15 分鐘，分離上清液與沉澱，回溶沉澱後取 500 μ g 的蛋白質，以體積 4:1 的比例加入 5x Protein Loading Buffer，於 95 °C 加熱 10

分鐘，加入蛋白質標準液以 10 % acrylamide 分離，stacking gel 以 100 伏特通電 15 分鐘，蛋白條帶到達 separating gel 後，以 200 伏特通電 75 分鐘，完成蛋白質分離後，以 100 伏特通電 60 分鐘將蛋白質轉印至 PVDF 膜上，以一抗濃度 1:2000 Anti-DDK pH 7.4 於 4 °C 下反應 16 小時後，以 TBS/0.1% tween 20 pH 7.4 洗去 PVDF 膜上之牛奶與一抗後，二抗濃度 1:2500 Anti-Rat antibody pH 8.2 於室溫下反應 90 分鐘後，以 alkaline phosphatase 與 BCIP、NBT 呈色 30 分鐘。Figure 16 中的一欄為 Hap1WT 的細胞膜、第二欄為 Hap1 WT 的細胞質、第三欄為 Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 基因之細胞膜、第四欄為 Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 基因之細胞質。由下圖 Figure 15 中第 1 欄與第 2 欄並沒有出現任何條帶，而第 3 欄在 28 kDa-35 kDa 的位置出現深紫色條帶，證明 TAZ 基因進入細胞，並使細胞中表達 tafazzin-DDK，於 anti-DDK 抗體辨認後搭配 AP 共軛呈色。

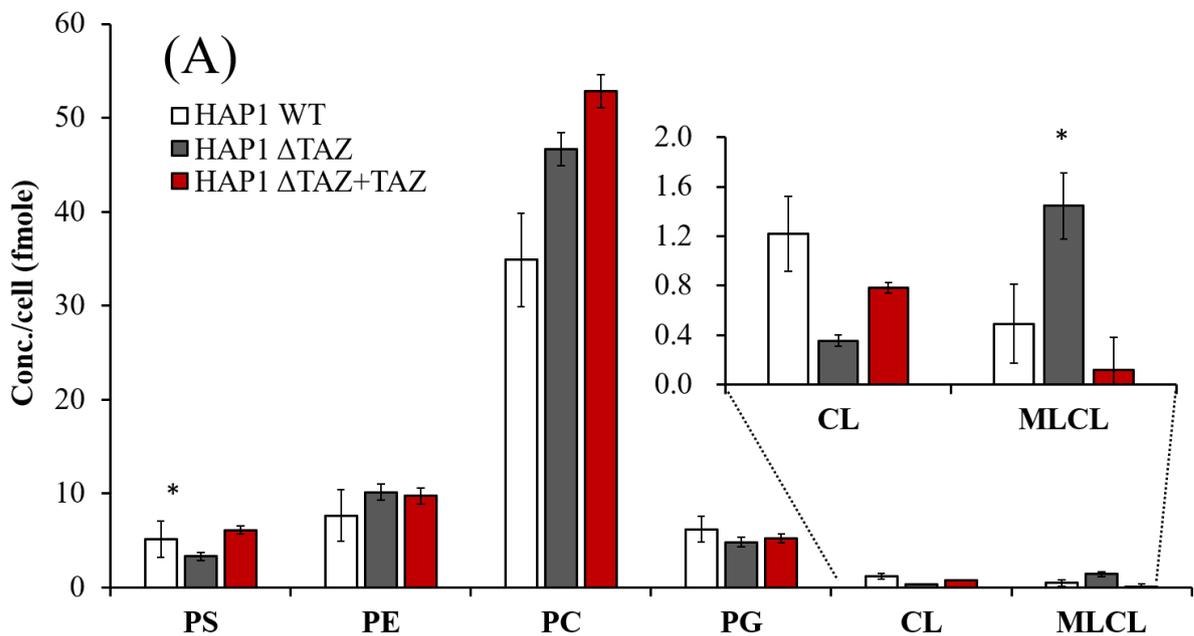


Figure 15、Hap1 Δ TAZ 細胞轉染轉染 TAZ 基因

第一欄為 Hap1 WT 的細胞膜；第二欄為 Hap1 WT 的細胞質；第三欄為 Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 基因之細胞膜；第四欄為 Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 基因之細胞質。Hap1 Δ TAZ 轉染 TAZ 基因培養 48 小時後進行西方墨點法，一級抗體使用 anti-DDK(1:2000)，二級抗體 anti-Rat 1:2500。

4.6 轉染 TAZ 對於巴氏症細胞中磷脂質之改變

在轉染 TAZ 使 Tafazzin 功能恢復後，首先可以看見 CL 的濃度升高了 219%(Figure 16A)而 MLCL 降低了 91.9%，使 CL 與 MLCL 的比值從未轉染前的 0.25 升高至 6.69。因 tafazzin 功能恢復而開成為受質的 PC，濃度沒有減少反而增加了 13.3%。PC 的前驅物之一 PE 濃度不變，最後 PS 的濃度升高了 84.8%。



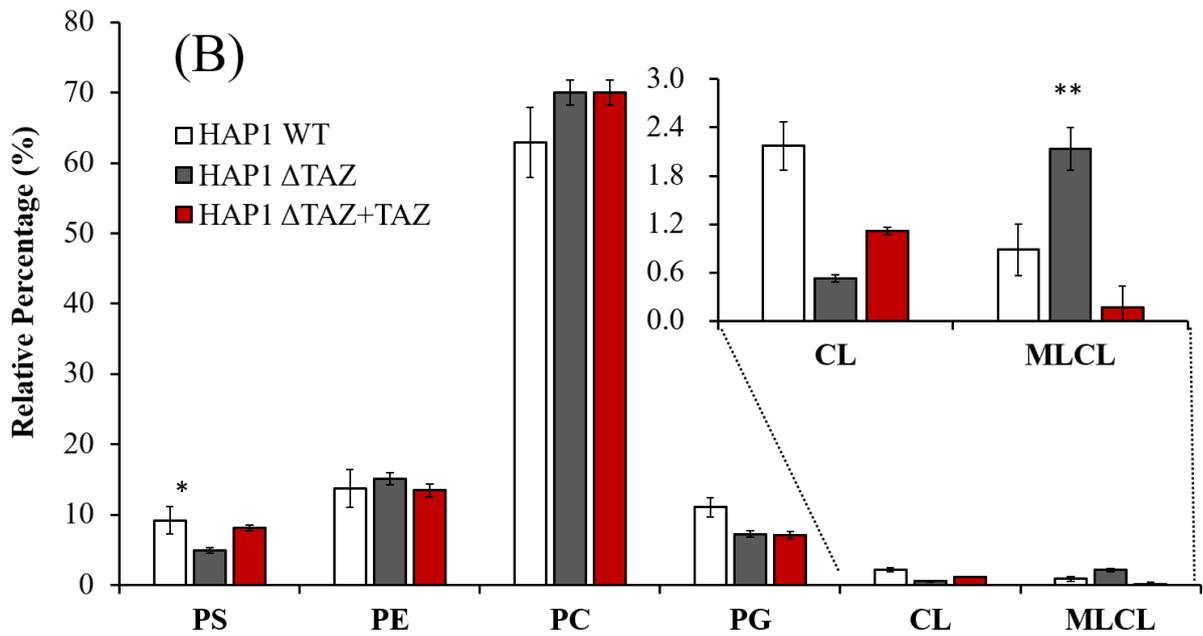


Figure 16、轉染 *TAZ* 後細胞內磷脂質的總量與相對含量

(A)各磷脂質在 Hap1 與巴氏症細胞中的總量，右上角的窗格為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質於每顆細胞內的濃度、橫軸為磷脂質的種類。(B)各磷脂質在 HAP1 與巴氏症每顆細胞中的相對含量，右上為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對含量，橫軸為磷脂質的種類，每種細胞的磷脂質總合為 100%。PS: phosphatidylserine ; PE:phosphatidylethanolamine ; PC:phosphatidylcholine ; PG: phosphatidylglycerol ; CL:cardiolipin ; MLCL:monolysocardiolipin。用液相層析串聯式質譜得出內標準品面積，再將生物樣品面積除以內標準品面積而得出樣品濃度計算而得得到細胞磷脂質濃度。白色: Hap1 WT ; 灰色:Hap1 Δ TAZ , 紅色: Hap1 Δ TAZ 轉染 *TAZ*。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.7 轉染 *TAZ* 對於 CL 組成的改變

將巴氏症細胞轉染 *TAZ*，使 tafazzin 功能恢復後，在主要的五個群落 CL 中，分別為 CL(66)、CL(68)、CL(70)、CL(72)與 CL(74)，這五個群落的醯基鏈組成皆由低雙鍵數移動至剛雙鍵數，雙鍵數全面增加(Figure 17)，皆整體 CL 的性質傾向具功能性的成熟 CL。此現象說明了轉染 tafazzin 確實能協助調控心磷脂醯基鏈的組成。

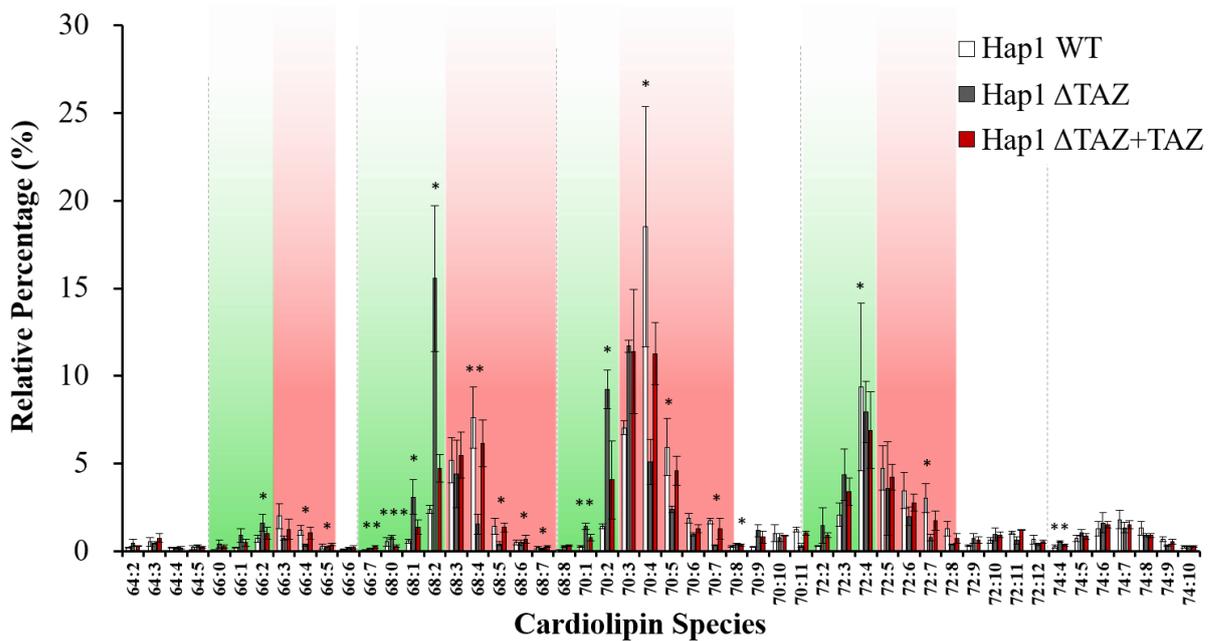


Figure 17、轉染 TAZ 對於 CL 組成的改變

圖為 CL 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 TAZ 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 CL 的組成種類，每種細胞的 CL 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 TAZ。紅色底為巴氏症細胞 TAZ 基因剔除細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

4.8 轉染 TAZ 對於 MLCL 組成的改變

轉染 TAZ 使 tafazzin 功能恢復後，降低了 MLCL(52)與 MLCL(54)中的含量(Figure 18)，解決了 MLCL (52)與 MLCL(54) 的在轉染 TAZ 基因前的堆積問題。此現象說明了 tafazzin 的確將帶有 16 與 18 個碳長的醯基鏈接至 MLCL 上。此外，轉染 TAZ 也造成了特定種類的 MLCL 上升，例如 MLCL(54:5)顯著上升與帶有較多雙鍵數的 MLCL(56:7)與 MLCL(56:8)上升並回復至正常含量。

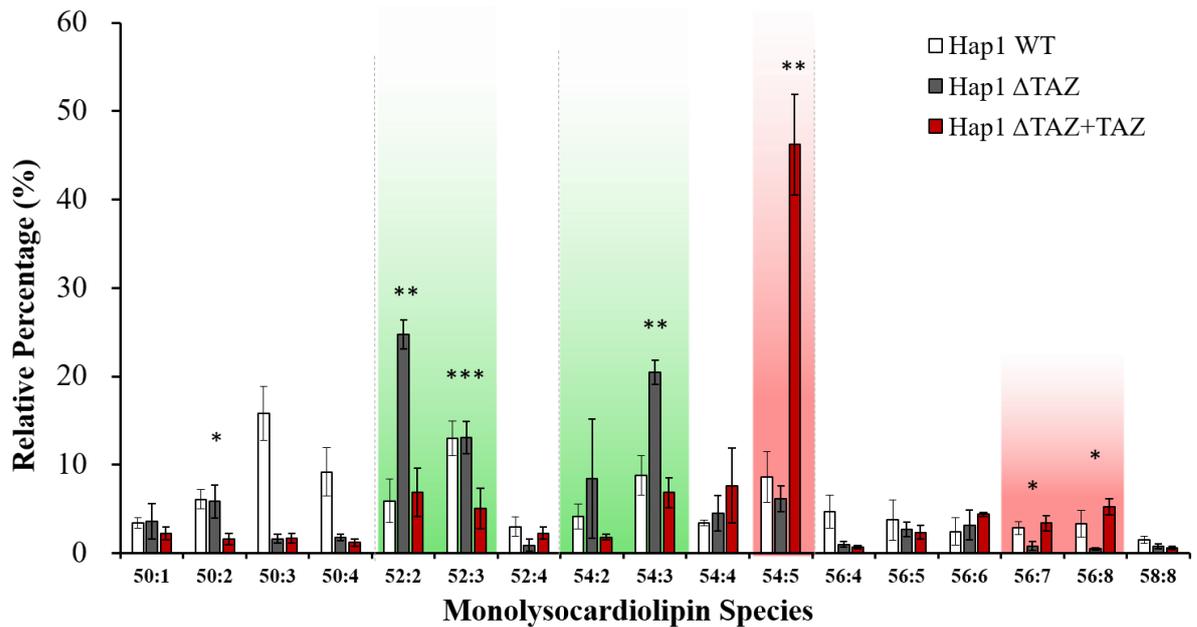


Figure 18、轉染 *TAZ* 對於 MLCL 組成的影響

圖為 MLCL 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 *TAZ* 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 MLCL 的組成種類，每種細胞的 MLCL 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 *TAZ*。紅色底為巴氏症細胞 *TAZ* 基因剔除細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.9 轉染 *TAZ* 對於 PG 組成的改變

將 *TAZ* 轉染至基因缺陷的細胞使 tafazzin 功能恢復後，PG 總量雖略為降低(Figure 16A)，但其組成也無明顯改變(Figure 19)皆由 PG(34:1)、PG(36:0)與 PG(38:0)所組成，而 PG 各組成含量差異也不大，除了 PG(36:0)微幅減少與 PG(38:0)微幅增加。這說明了上游產物 PG，不論是基因剔除或是基因轉染，組成與合成皆不受影響。

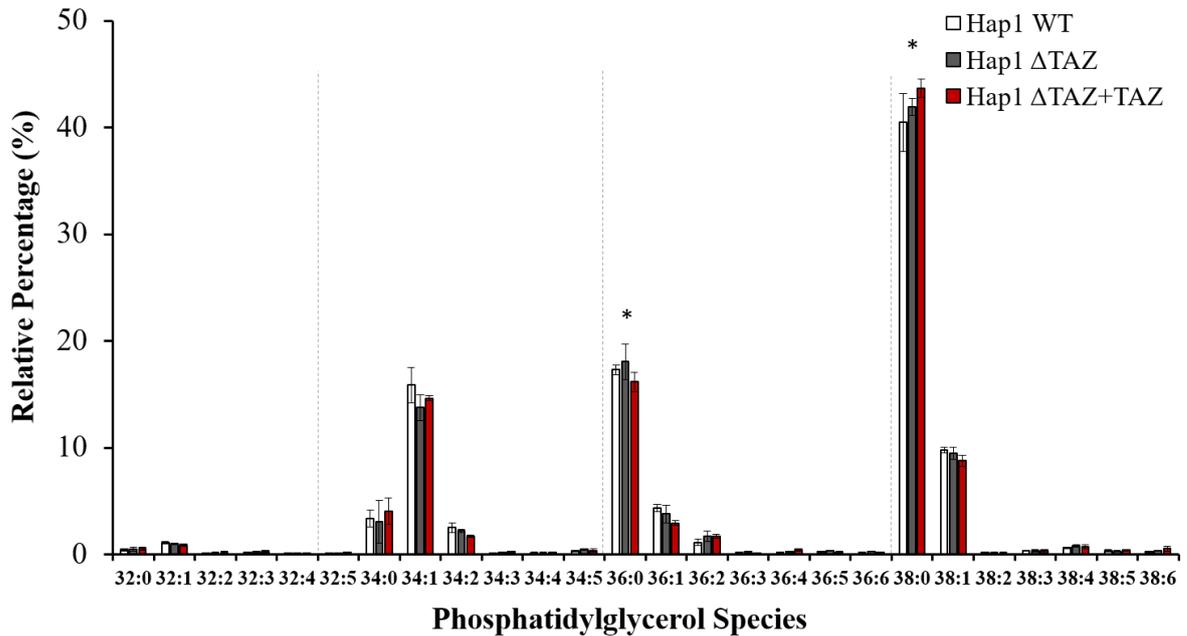


Figure 19、轉染 *TAZ* 對於 PG 組成的影響

圖為 PG 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 *TAZ* 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PG 的組成種類，每種細胞的 PG 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 *TAZ*。紅色底為巴氏症細胞 *TAZ* 基因剔除細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.10 轉染 *TAZ* 對於 PC 組成的改變

經轉染 *TAZ* 使 tafazzin 酵素恢復功能後，雖然有恢復調節 CL 與 MLCL 的功能，但身為 tafazzin 受質的 PC 卻不減反增(Figure 16A)，且雙鍵數甚至還增加(Figure 20)，這說明了 PC 不是唯一提供醯基鏈給 CL 的脂質，且 tafazzin 也不會專一提取 PC 所提供的醯基鏈，也會從其他磷脂質的水解產物提曲醯基鏈。

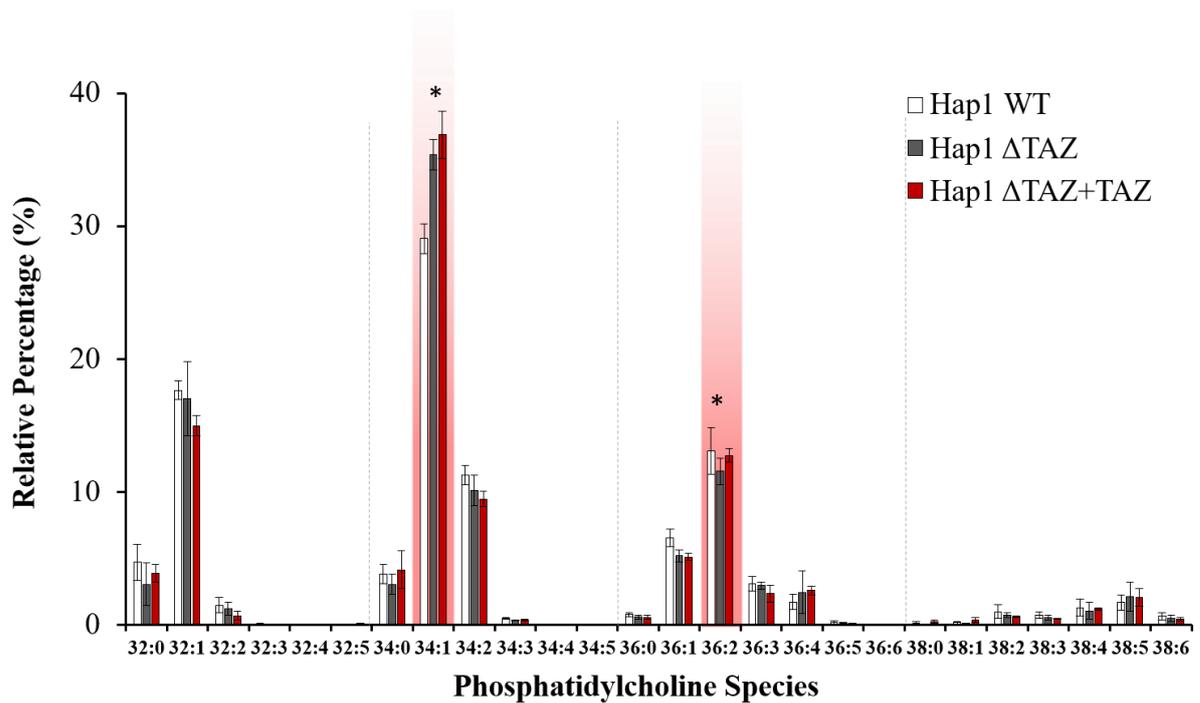


Figure 20、轉染 *TAZ* 對於 PC 組成的影響

圖為 PC 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 *TAZ* 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PC 的組成種類，每種細胞的 PC 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 *TAZ*。紅色底為巴氏症細胞 *TAZ* 基因剔除細胞增加的部分。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.11 轉染 *TAZ* 對於 PE 組成的改變

轉染 *TAZ* 使 tafazzin 功能恢復後，PE 總量不變(Figure 16A)，組成種類亦由 PE(34)、PE(38)與 PE(38)所組成(Figure 21)。而 PE(36:1)含量下降了且 PE(36:2)含量上升，PE(36)的雙鍵增加。此現象說明轉染 *TAZ*，恢復功能的 tafazzin 並不會將 PE 作為受質去水解其醯基鏈。

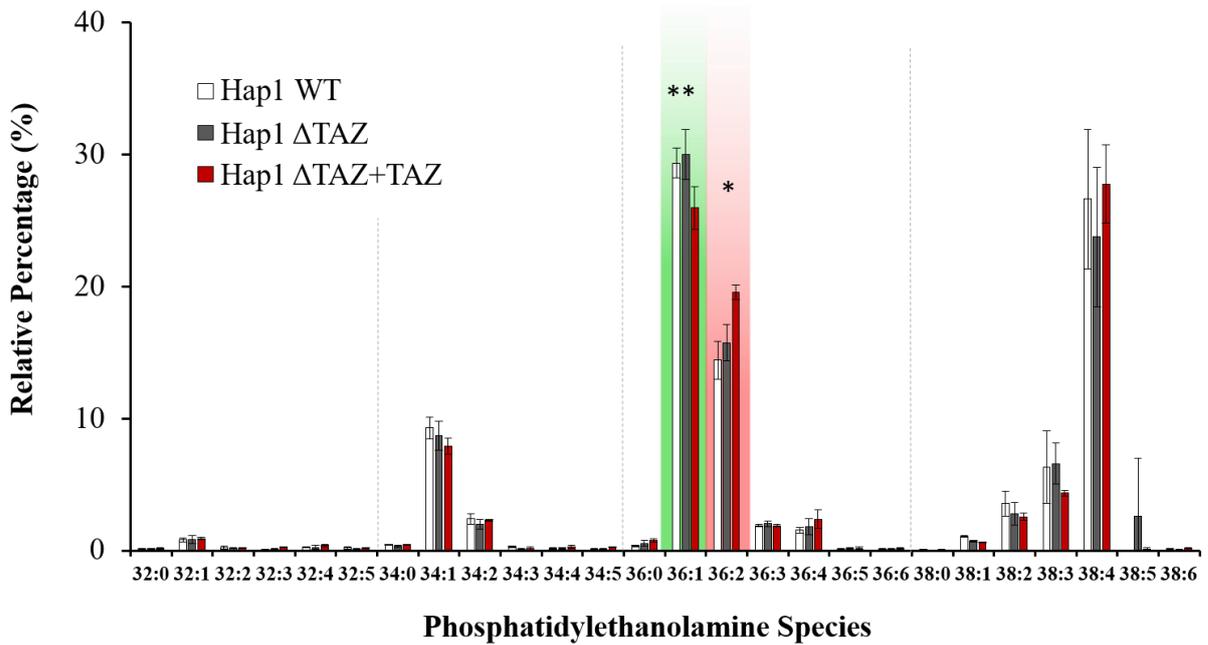


Figure 21、轉染 *TAZ* 對於 PE 組成的影響

圖為 PE 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 *TAZ* 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PE 的組成種類，每種細胞的 PE 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 *TAZ*。紅色底為巴氏症細胞 *TAZ* 基因剔除細胞細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.12 轉染 *TAZ* 對於 PS 組成的改變

轉染 *TAZ* 使 tafazzin 恢復功能後，濃度方面 PS 有恢復至 WT 的含量(Figure 16A)，主要組成依舊皆由 PS(34)、PS(36)與 PS(38)組成。經轉染 *TAZ* 後，沒有將原本下降的 PS(36:0)復原(Figure 22)。

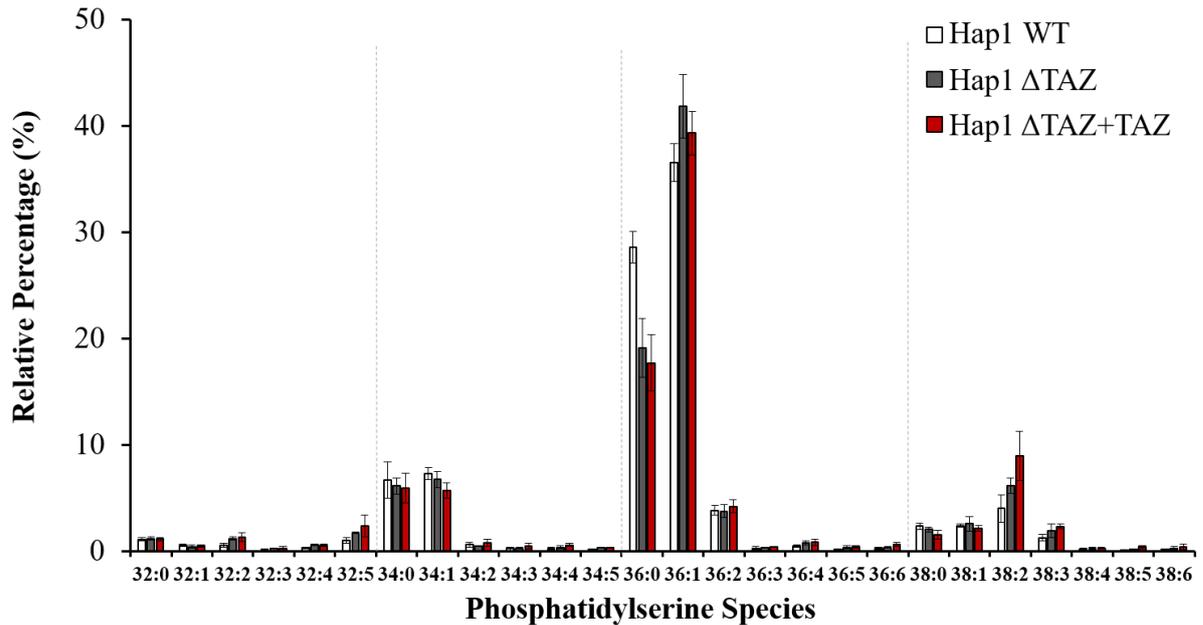


Figure 22、轉染 *TAZ* 對於 PS 組成的影響

圖為 PS 在與巴氏症細胞與巴氏症細胞轉染 *TAZ* 中的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PS 的組成種類，每種細胞的 PS 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、紅色為巴氏症細胞轉染 *TAZ*。紅色底為巴氏症細胞 *TAZ* 基因剔除細胞增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

4.13 轉染 *TAZ* 對於磷脂質合成路徑的改變

轉染 *TAZ* 能活化 MLCL 與新生 CL 的醯基鏈重組路徑(Figure 23)，有效地使 CL 雙鍵數增加，趨於成熟的高雙鍵數 CL。而此效應來自於 Tafazzin 將醯基鏈轉移至 MLCL，因此造成 MLCL 的濃度明顯降低，且低於正常細胞株，先前 RT-qPCR 實驗指出在 *TAZ* 基因剔除的情況下會增強 *iPLA2 β* 及 *iPLA2 γ* 的基因表達而使 MLCL 與 dilysocardiolipin 增加，而被 *iPLA2 β* 及 *iPLA2 γ* 水解的醯基鏈可能被過量 tafazzin 轉移到 CL 上。先前 RT-qPCR 實驗也證實 CL 合成酶(CLS)會因 *TAZ* 轉染而增加其基因表達，但是 PG 不因轉染而有明顯濃度及種類的變化，因而推測新生 CL 的生成，並未因 MLCL 協助產生成熟

CL 而停止或減緩生成，故 CL 總量有明顯提升，但未完全達到基因剔除前的濃度，似乎轉染之 Tafazzin 與原生 Tafazzin 有些許差異。轉染 TAZ 後總磷脂質量有些微上升，除了 CL 增加及 MLCL 降低較為明顯，尤其以 PC 的增加最為顯著，雖然以比例計算後並無變化。然而，Tafazzin 恢復功能後並沒有看見 PC 被作為受質的跡象，因為 PC 含量不減反增且雙鍵數變化不明顯，並不符合做為 tafazzin 受質的要素，這與前一章節之 PC 為主要提供醯基鏈之磷脂質相互抵觸，但也非實驗中所偵測之 PE、PS 或 PG。推估 Tafazzin 轉染可能驅使細胞中的去飽和酶活化，產生成熟 CL 所需之高雙鍵脂肪酸，造成幾乎各種磷脂質皆有雙鍵數上升的情況。PE 含量不變，雙鍵數增加，推估是因為 PSS2 被活化使 PS 含量上升與雙鍵數上升。

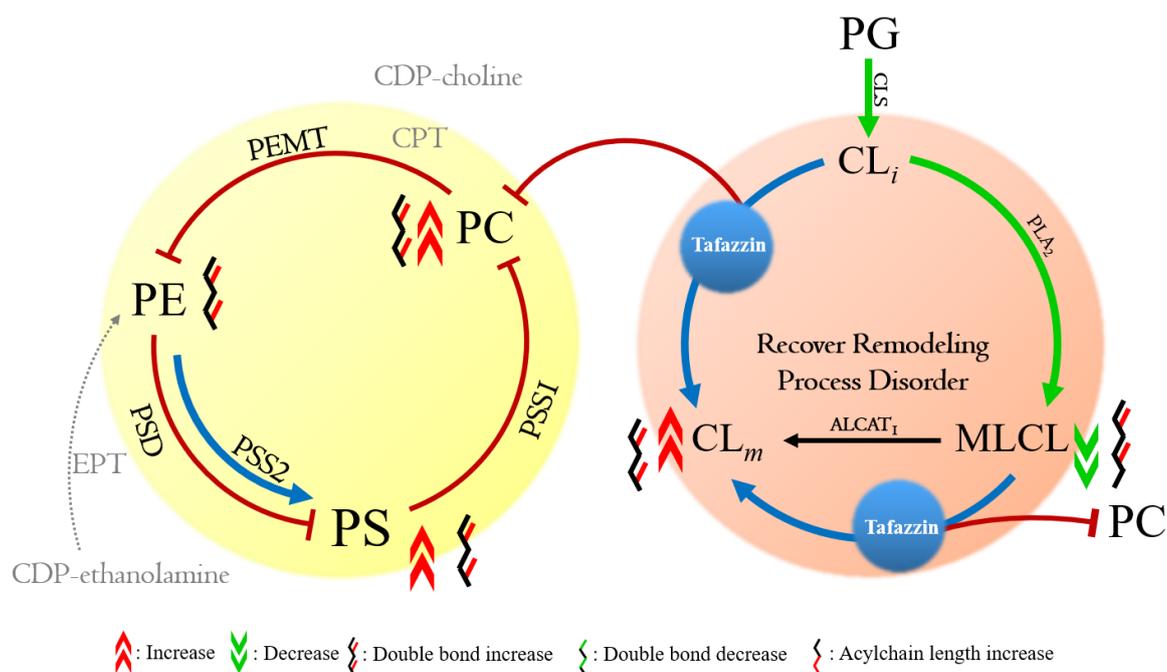


Figure 23、轉染 TAZ 對於磷脂質合成路徑的改變

圖為 CL 與其他磷脂質的合成圖，右邊為 CL 重塑機制，左邊為 PC、PE、PS 的合成機制。綠色為不受基因剔除影響的路徑，藍色箭頭為活化路徑，紅色路徑為受基因剔除影響路徑。綠色向下雙箭頭為含量下降，紅色向上雙箭頭為含量上升，碳鏈上的雙鍵紅標為雙鍵數上升、灰標為碳長變短、單鍵綠標為雙鍵數減少。

第五章 脂質治療

5.1 材料

Phosphatidylglycerol, 18:1/18:1 購買於 Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)。

5.2 Hap1 ΔTAZ 添加 phosphatidylglycerol (18:1)₂

原始濃度 25 mg/mL DOPG 以氮氣去除三氯甲烷，並以乙醇回溶後，將 4.0×10^6 顆細胞置於 10 cm 培養皿中以 37 °C，5%二氧化碳中培養，於 0、24 小時添加 DOPG 50 μ M，並於 48 小時收集細胞(Figure 24)。

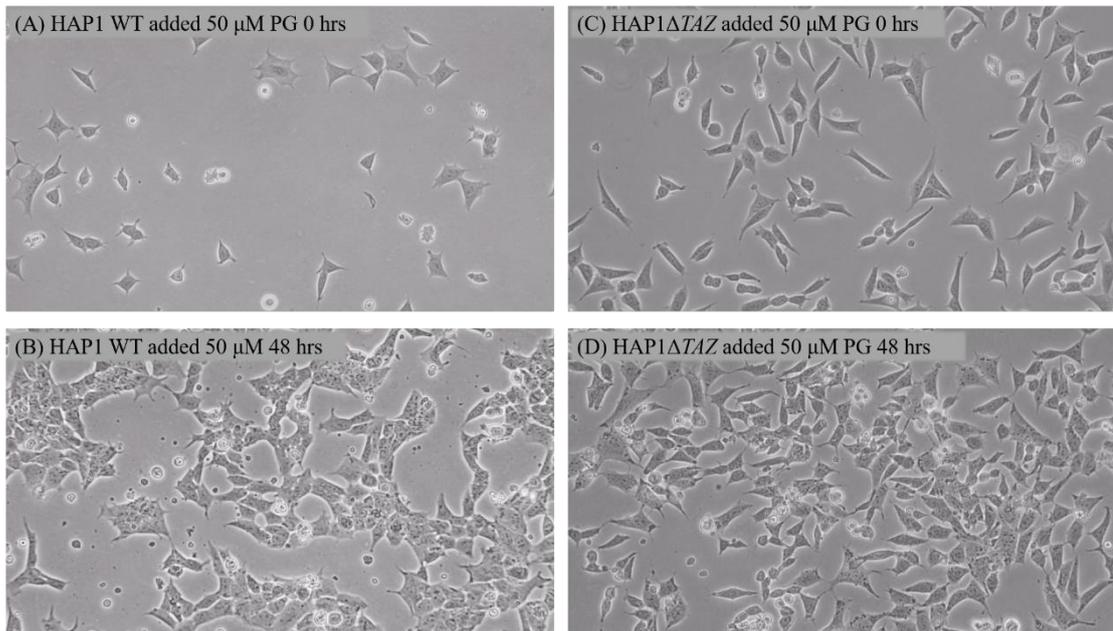
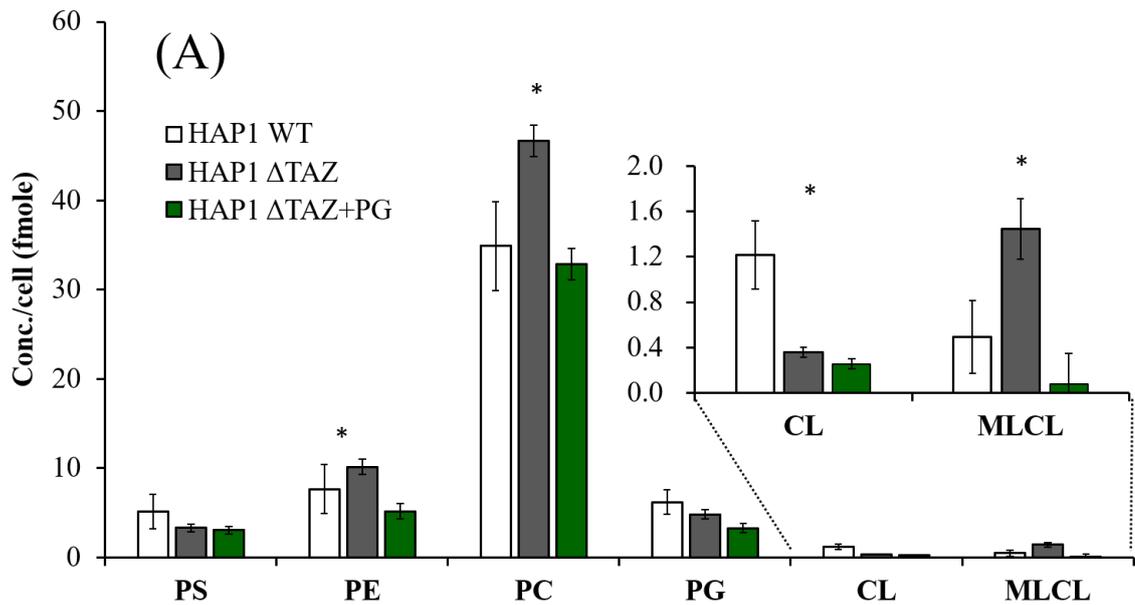


Figure 24、Hap1 WT 與 Hap1 ΔTAZ 添加 50 μ M PG(18:1)₂

(A) Hap1 WT 添加 PG 0 小時。(B) Hap1 WT 添加 PG 48 小時。(C) Hap1 ΔTAZ 添加 PG 0 小時。(D) Hap1 ΔTAZ 添加 PG 48 小時。

5.3 PG 治療效應

添加 PG(18:1)₂ 至 Hap1 Δ TAZ 細胞中，作為能直接合成出成熟 CL 的原料。雖然細胞內 CL 與 MLCL 濃度分別下降 28%與 94.4%(Figure 25A)，但 CL 與 MLCL 的比值從 Δ TAZ 的 0.25 回升至 3.13。另外添加 PG(18:1)₂ 後，PG 的含量不增反減，下降了 32%。PC 則減少了 29.6%。PE 濃度下降達 48%。PS 濃度沒有變化。



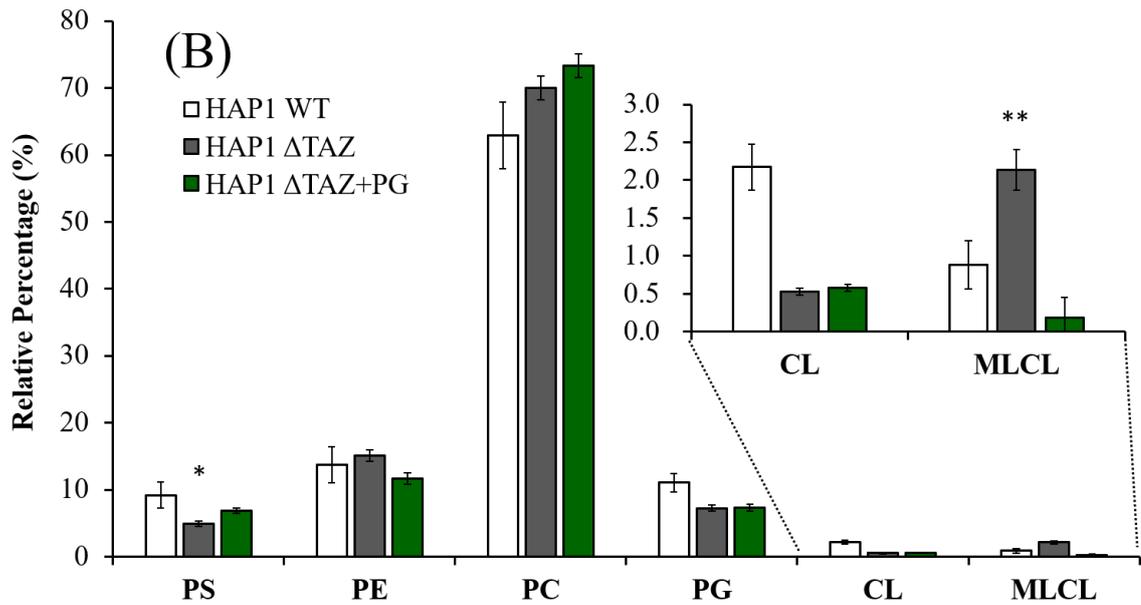


Figure 25、添加 PG(18:1)₂ 細胞內磷脂質的總量與相對含量

(A)各磷脂質在 Hap1 與巴氏症細胞中的總量，右上角的窗格為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質於每顆細胞內的濃度、橫軸為磷脂質的種類。(B)各磷脂質在 HAP1 與巴氏症每顆細胞中的相對含量，右上為 CL 與 MLCL 的放大圖。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對含量，橫軸為磷脂質的種類，每種細胞的磷脂質總合為 100%。PS: phosphatidylserine ; PE:phosphatidylethanolamine ; PC:phosphatidylcholine ; PG: phosphatidylglycerol ; CL:cardiolipin ; MLCL:monolysocardiolipin。用液相層析串聯式質譜得出內標準品面積，再將生物樣品面積除以內標準品面積而得出樣品濃度計算而得得到細胞磷脂質濃度。白色:Hap1 WT;灰色:Hap1 ΔTAZ，綠色: Hap1 ΔTAZ 添加 PG(18:1)₂。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計 (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.1 添加 PG(18:1)₂ 對於 CL 的組成影響

添加 PG(18:1)₂ 後對於 CL 的改變(Figure 26)，能夠看見 CL 66、CL 68 與 CL 70 這些中短碳鏈含量減少而中長碳鏈的 CL(72)與 CL(74)含量變多。尤其是在 CL(72:4)。因為 CL (72:4)是由 4 條碳長為 18 的醯基鏈組成，而我們添加 PG 的醯基鏈就是(18:1)，所以能看見在 CL 72:4 組成有明顯的增加，說明了額外添加的 PG 確實有被合成出

CL。

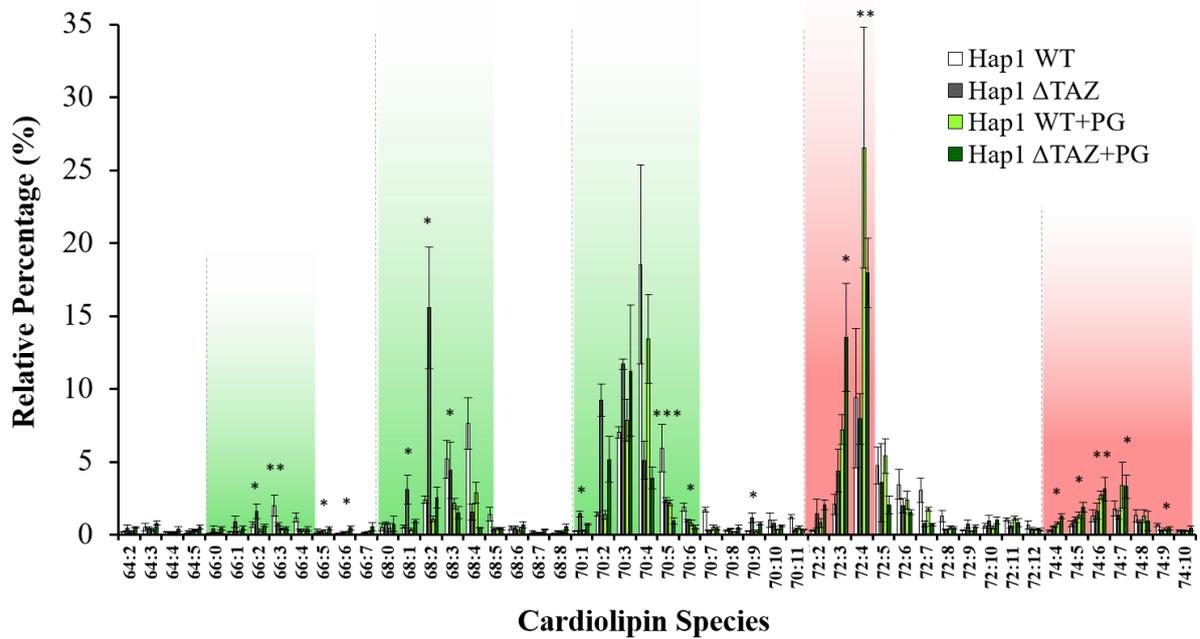


Figure 26、添加 PG(18:1)₂ 對於巴氏症細胞 CL 組成的影響

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 CL 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 MLCL 的組成種類，每種細胞的 CL 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.2 添加 PG(18:1)₂ 對於 MLCL 組成差異

添加 PG(18:1)₂ 後 MLCL 的趨勢變化與 CL 類似，除了含量都會下降以外，也同樣會讓帶有 18:1 醯基鏈組成大幅增加(Figure 27)，只不過 MLCL 比 CL 要少一條醯基鏈是 MLCL(54:3)。前述現象說明了添加 PG 確實能促進 CL 合成並恢復 CL 與 MLCL 的比值。由於添加 PG(18:1)₂ 後合成的出來的 CL(72)種類增加，被 PLA₂ 水解掉的 CL(72)也會變多，造成 MLCL(54)的含量相對上升，MLCL(52)含量相對下降。

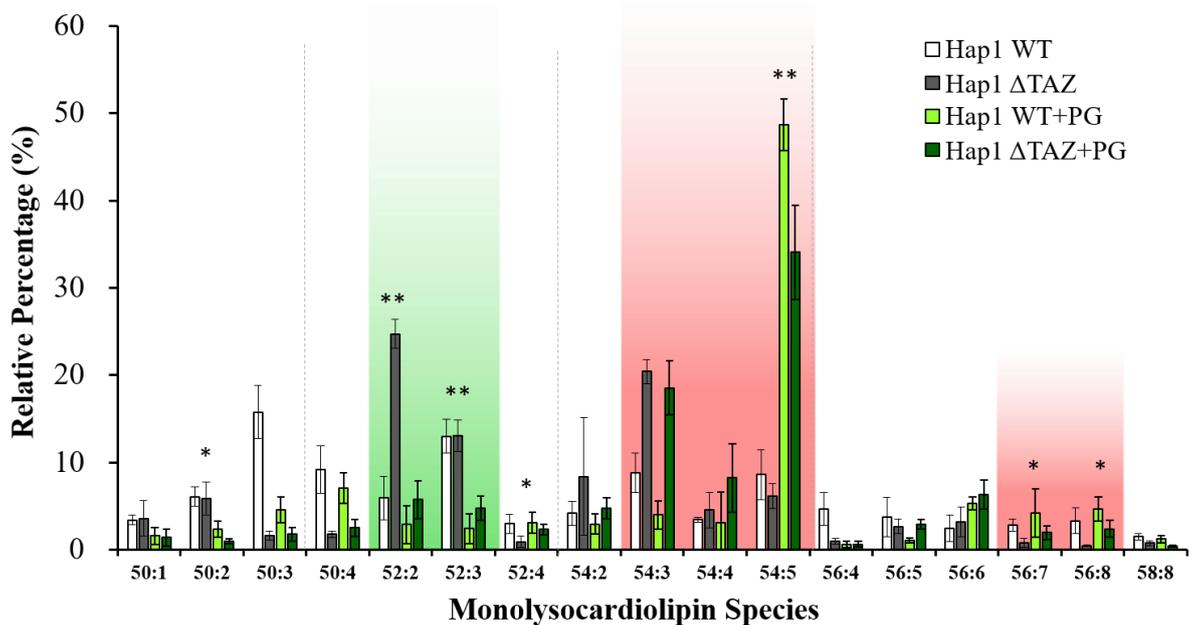


Figure 27、添加 PG(18:1)₂ 對於 MLCL 組成差異圖

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 MLCL 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 MLCL 的組成種類，每種細胞的 MLCL 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.3 添加 PG(18:1)₂ 對於 PG 組成差異

非常意外的，在添加 50 μM PG(18:1)₂，不僅沒有讓細胞中的 PG 總量提高(Figure 25A)，甚至還降低。但值得注意的是添加 PG 後，可以看到 PG(36:0)與 PG(36:1)的相對含量減少而 PG(34:1)；(36:2)含量相對增加(Figure 28)，說明了添加 PG(18:1)₂ 確實有被細胞攝入，且其醯基鏈(18:1)成為細胞磷脂質的一部分，且 PG 中的醯基鏈可以互相置換。

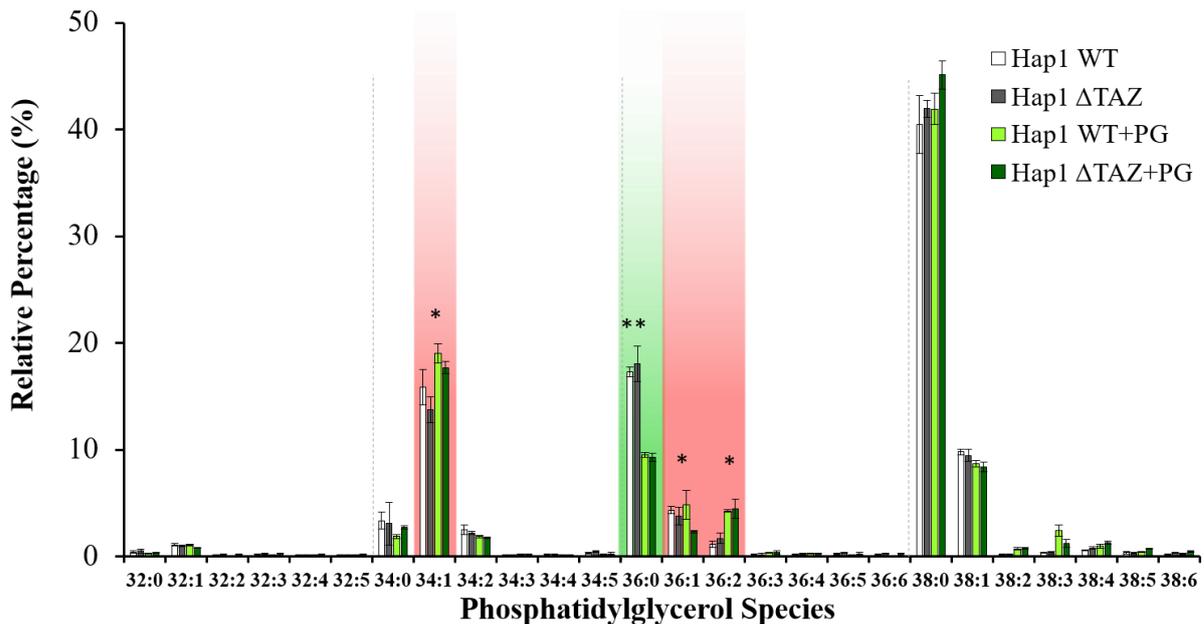


Figure 28、添加 PG(18:1)₂ 對於 PG 組成差異圖

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 PG 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PG 的組成種類，每種細胞的 PG 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.4 添加 PG(18:1)₂ 對於 PC 組成差異

添加 PG，細胞中 PC 的總量明顯降低(Figure 25A)，但 PC 的醯基鏈組成趨向 18:1 (Figure 29)，造成 PG(36:2)明顯增加，此現象說明了過量的 PG (18:1)₂ 會被細胞自行分解，而其中 PG (18:1)的醯基鏈會被 PC 吸收，故能看見短碳鏈的 PC(32:1)減少，長碳鏈的 PC(36:2)增加。

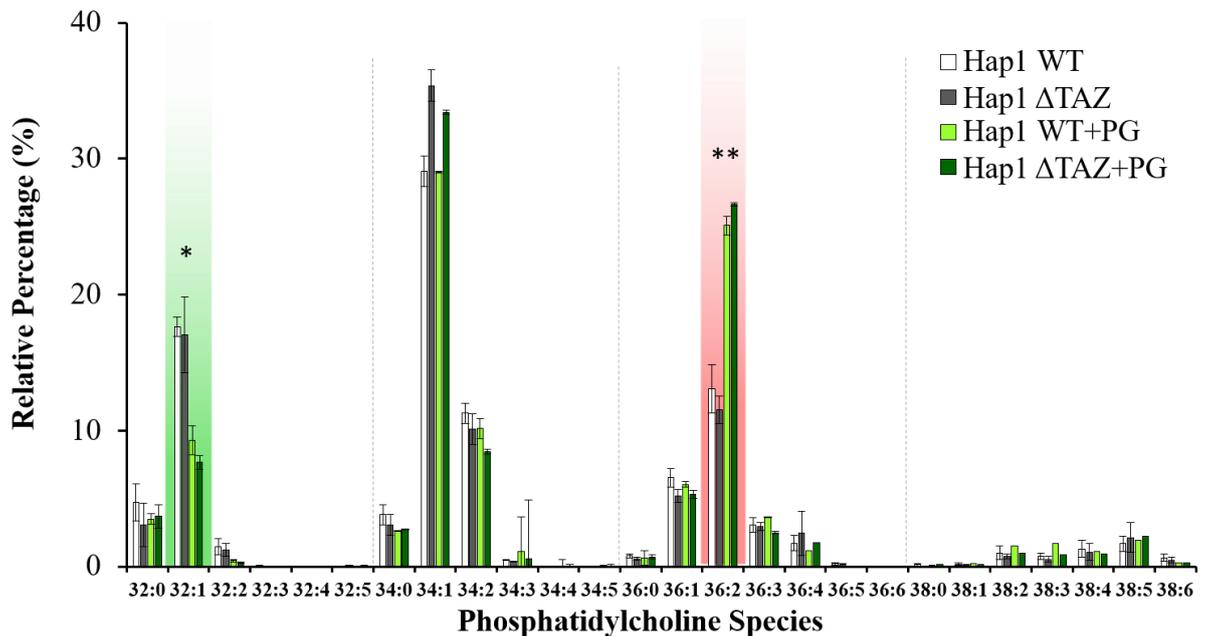


Figure 29、添加 PG(18:1)₂ 對於 PC 組成差異圖

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 PC 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PC 的組成種類，每種細胞的 PC 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.5 添加 PG(18:1)₂ 對於 PE 組成差異

添加 PG(18:1)₂ 後使 PE 的醯基鏈組成趨向 18:1 且 18:1 的醯基鏈取代了部分 PG 的醯基鏈使 PG(34:1)與 PG(34:2)的含量下降，而 PE(36:1)與 PE(36:2)的含量上升 (Figure 30)。同樣因為過量的 PG (18:1)₂ 會被細胞自行分解，而其中(18:1)的醯基鏈就會被 PE 吸收而使 PE(36:1)與 PE(36:2)增加。不只有巴氏症細胞有此現象，在 Hap1 WT 細胞中也出現這樣的趨勢。

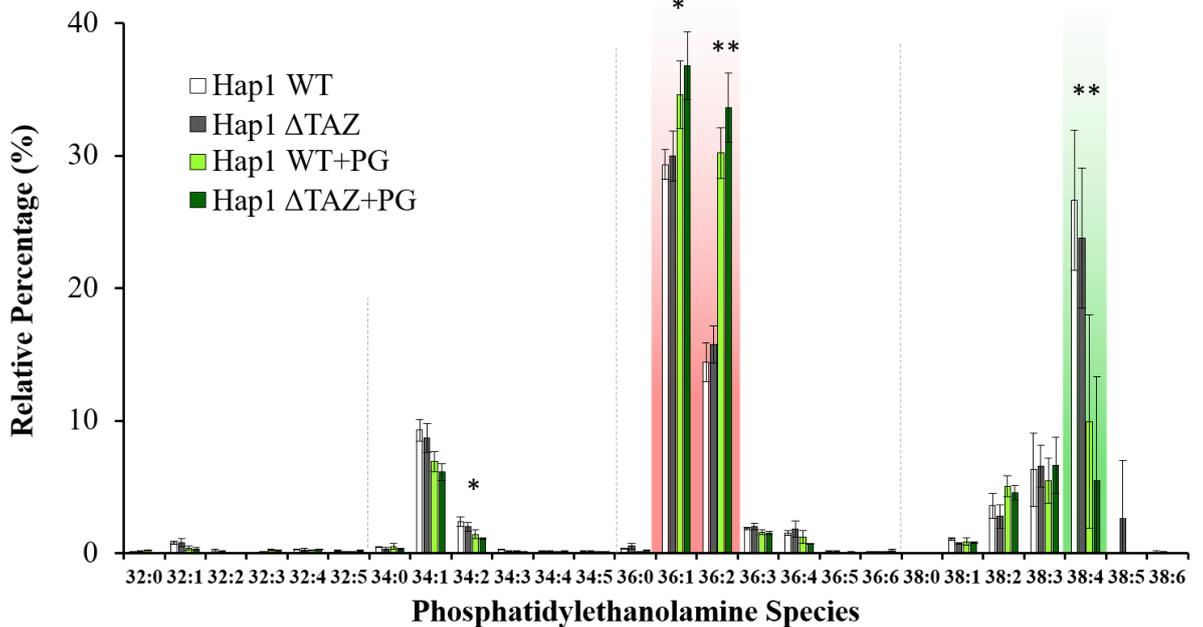


Figure 30、添加 PG(18:1)₂ 對於 PE 組成差異圖

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 PE 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PE 的組成種類，每種細胞的 PE 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.6 添加 PG(18:1)₂ 對於 PS 組成差異

添加 PG 後，PG 中(18:1)₂ 的醯基鏈也有被 PS 接收(Figure 31)，使 PS(36:2)上升，所以 PS(34)含量就相對減少，顯示添加 PG 後 18:1 的醯基鏈取代了原本 16:0 與 16:1 之醯基鏈，使 PS 醯基鏈長度增加。

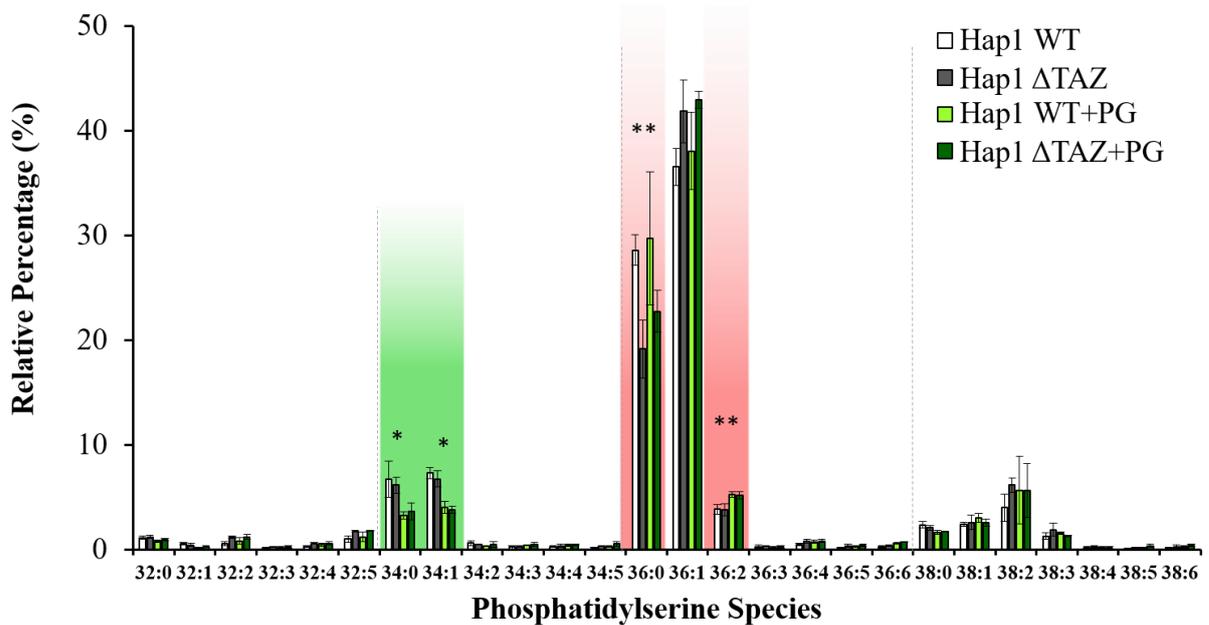


Figure 31、添加 PG(18:1)₂ 對於 PS 組成差異圖

圖為巴氏症細胞與添加 PG 至巴氏症細胞中 PS 的相對含量。縱軸為磷脂質在每顆細胞內的相對百分比，橫軸為 PS 的組成種類，每種細胞的 PS 總合為 100%。白色為 WT、灰色為巴氏症細胞、淺綠色為 WT 細胞添加 PG、深綠色為巴氏症細胞添加 PG。紅色底為巴氏症細胞添加 PG 後增加的部分，綠色為減少。以上數據由三次獨立實驗統計而成，並以 Microsoft Excel 進行 Student t-Test 統計(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

5.7 添加 PG(18:1)₂ 對於磷脂質合成路徑的差異

添加 PG(18:1)₂ 補充合成 CL 的原料，能讓細胞直接合成出成熟 CL(Figure 32)。因為 PG 為外部添加，因此最容易察看 PG 添加後轉化的流向，除了 CL 與 MLCL 有非常明顯(18:1)轉化外，也可另外觀察出 PC 與 PE 都有較為明顯(18:1)醯基鏈的轉入，但 PG 本身的變化卻較不明顯，顯見 PG 的添加會快速造成細胞內轉化成其他磷脂質，以維持其恆定。以 CL 的角度來看，PG 的添加並沒有讓 CL 的濃度增加，雖然濃度沒有增加，但是 PG 的(18:1)醯基鏈確實有被轉化成 CL(72:4)。MLCL 的濃度有明顯下降，且 MLCL(54:3)的含量也顯著增加且鏈長增加，顯示添加 PG 確實能回復 CL 與 MLCL 的比

值。根據實驗室先前的研究，PG 的添加會抑制 $iPLA_2\beta$ 及 $iPLA_2\gamma$ 的基因表達，因為這兩種酶會水解粒線體中 CL，這也解釋為何 MLCL 會大量的減少。

PC 的變化與巴氏症細胞相當不同，在 *TAZ* 基因剔除後，tafazzin 已經失去功能無法將 PC 作為受質的情況下，因此 PC 的含量大量增加(第四章)，但在添加 PG 後 PC 含量下降至正常 WT 細胞水準，組成雙鍵數增加與碳鏈增長。PE 的含量也是下降且雙鍵數增加，有相同的現象。最後 PS 的含量不變，碳鏈增長雙鍵數增加。結果顯示添加 $PG(18:1)_2$ ，只有 PG 與 PS 的總量沒有變化，其餘的磷脂質的含量全部降低。推測 PG 添加後，除了提供 CL 合成外，多餘之 PG 則平均轉化為各種磷脂質，也有效地降低因基因剔除造成的磷脂質組成變異。

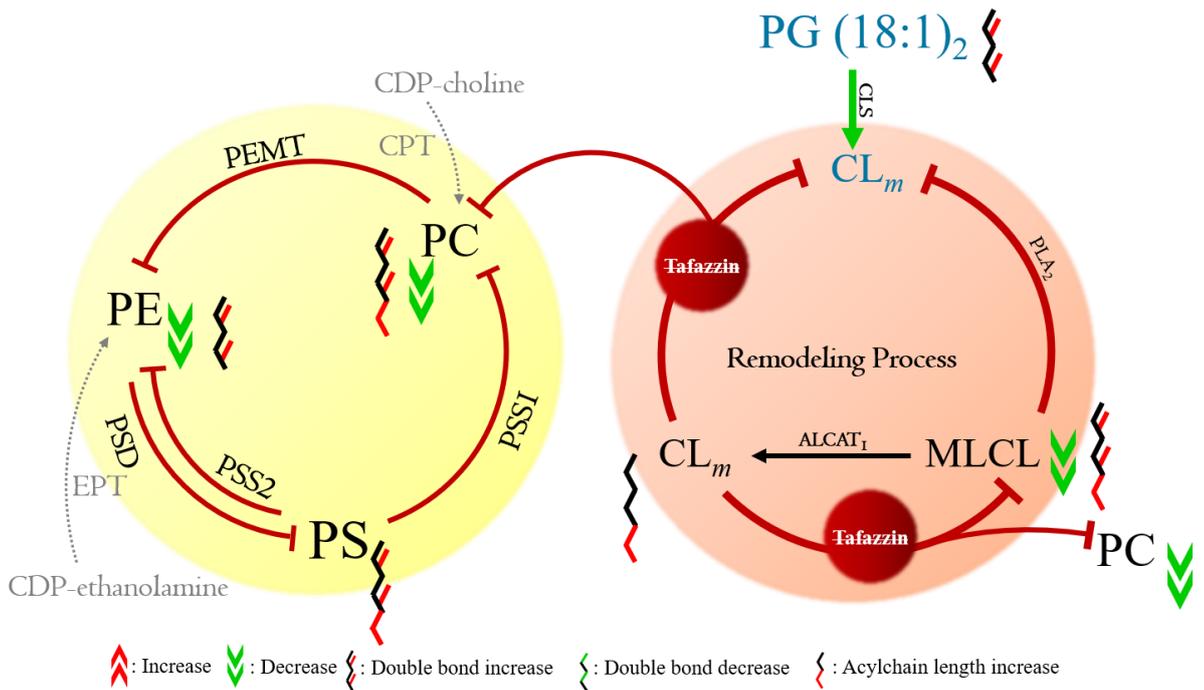


Figure 32、添加 PG 對於磷脂質合成的影響

圖為 CL 與其他磷脂質的合成圖，右邊為 CL 重塑機制，左邊為 PC、PE、PS 的合成機制。綠色為不受基因剔除影響的路徑，藍色箭頭為活化路徑，紅色路徑為受基因剔除影響路徑。綠色向下雙箭頭為含量下降，紅色向上雙箭頭為含量上升，碳鏈上的雙鍵紅標為雙鍵數上升、灰標為碳長變短、單鍵綠標為雙鍵數減少。

第六章 結論

我們觀察到了將 Hap1 細胞中 *TAZ* 基因剔除後，會使 PS 總量下降及醯基鏈飽和度下降；PC 總量上升；CL 總量下降且飽和度增加同時也會使 MLCL 總量增加且短碳鏈減少。PS 方面原因可能是合成 PS 的 PSS2 被抑制而水解 PS 的 PSD 沒有被抑制而造成 PS 下降，此推論需要其他實驗如 RT-PCR 針對酵素的 mRNA 表達量去進行驗證；PC 則是因為 tafazzin 失去功能無法將 PC 作為受質而使 PC 堆積；CL 雙鍵數減少的原因為 tafazzin 失去功能後無法有效轉移不飽和醯基鏈；MLCL 短碳鏈減少的原因為 PLA 會專一水解新生 CL 的短醯基鏈。

經過轉染 *TAZ* 使 tafazzin 功能恢復後，不只 CL 與 MLCL 的比值恢復且碳鏈及雙鍵數組成也恢復於接近 WT 的組成。但 PC 則是總量及雙鍵數皆增加，可知轉染後的 tafazzin 並沒有將 PC 作為受質使用，醯基鏈的來源可能取自 *iPLA₂β* 及 *iPLA₂γ* 的水解產物，另外 PC 上升的原因亦有可能是轉染試劑中的奈米之質體被細胞膜所吸收而使 PC 含量顯著上升。

添加 PG 方面，能夠跳過 CL 的重整路徑使 CL 與 MLCL 的比值恢復，PG(18:1)₂ 直接提供了合成成熟 CL 的部分原料，使 CL(18)₄ 及 MLCL(18)₃ 的組成增加，過剩的 PG(18:1)₂ 其醯基鏈也會散布到細胞中並由 PS、PE 及 PC 吸收，故造成由 18 個碳長醯基鏈組成 PS、PE 與 PC 比率增加。

第七章 參考文獻

1. Adès, L.C., et al., *Barth syndrome: Clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28*. American Journal of Medical Genetics, 1993. **45**(3): p. 327-334.
2. Hoch, F.L., *Lipids and thyroid hormones*. Prog Lipid Res, 1988. **27**(3): p. 199-270.
3. Pignatelli, R.H., et al., *Clinical characterization of left ventricular noncompaction in children: a relatively common form of cardiomyopathy*. Circulation, 2003. **108**(21): p. 2672-8.
4. Spencer, C.T., et al., *Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome*. Pediatrics, 2006. **118**(2): p. e337-46.
5. Schlame, M., Y. Xu, and M. Ren, *The Basis for Acyl Specificity in the Tafazzin Reaction*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(13): p. 5499-5506.
6. Clarke, S.L.N., et al., *Barth syndrome*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2013. **8**(1): p. 23.
7. Jefferies, J.L., *Barth syndrome*. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 2013. **163**(3): p. 198-205.
8. Brandner, K., et al., *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): p. 5202-14.
9. Heath, R.J. and C.O. Rock, *A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis*. J Bacteriol, 1998. **180**(6): p. 1425-30.
10. Tyurina, Y.Y., et al., *Characterization of cardiolipins and their oxidation products by LC-MS analysis*. Chemistry and physics of lipids, 2014. **179**: p. 3-10.
11. Robinson, N.C., *Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase*. J Bioenerg Biomembr, 1993. **25**(2): p. 153-63.
12. Schlame, M., D. Rua, and M.L. Greenberg, *The biosynthesis and functional role of cardiolipin*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(3): p. 257-88.
13. Chu, C.T., H. Bayir, and V.E. Kagan, *LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease*. Autophagy, 2014. **10**(2): p. 376-8.
14. Zapala, B., T. Platek, and I. Wybranska, *A novel TAZ gene mutation and mosaicism in a Polish family with Barth syndrome*. Ann Hum Genet, 2015. **79**(3): p. 218-24.
15. Eble, K.S., et al., *Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Journal of

- Biological Chemistry, 1990. **265**(32): p. 19434-40.
16. Zhu, J., K.Z. Wang, and C.T. Chu, *After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival*. *Autophagy*, 2013. **9**(11): p. 1663-76.
 17. Chicco, A.J. and G.C. Sparagna, *Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C33-44.
 18. Schlame, M. and M. Ren, *The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1788**(10): p. 2080-3.
 19. Ardail, D., et al., *Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(31): p. 18797-802.
 20. Liu, J., et al., *Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(12): p. 892-902.
 21. Renner, L.D. and D.B. Weibel, *Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(15): p. 6264-6269.
 22. Elias-Wolff, F., et al., *Curvature sensing by cardiolipin in simulated buckled membranes*. *Soft Matter*, 2019. **15**(4): p. 792-802.
 23. Vreken, P., et al., *Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **279**(2): p. 378-82.
 24. Houtkooper, R.H., et al., *Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome*. *Anal Biochem*, 2009. **387**(2): p. 230-7.
 25. Schlame, M., et al., *Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. **42**(11): p. 1994-1999.
 26. Zachowski, A., *Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement*. *Biochemical Journal*, 1993. **294**(Pt 1): p. 1-14.
 27. Bevers, E.M., et al., *Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets*. *Eur J Biochem*, 1982. **122**(2): p. 429-36.
 28. Williamson, P., et al., *Continuous Analysis of the Mechanism of Activated Transbilayer Lipid Movement in Platelets*. *Biochemistry*, 1995. **34**(33): p. 10448-10455.
 29. Majumder, R., et al., *A phosphatidylserine binding site in factor V_a C1 domain regulates both assembly and activity of the prothrombinase complex*. *Blood*, 2008. **112**(7): p. 2795-2802.
 30. Kennedy, E.P. and S.B. Weiss, *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides*. *J Biol Chem*, 1956. **222**(1): p. 193-214.
 31. Martin, R.G. and B.N. Ames, *A Method for Determining the Sedimentation Behavior*

- of Enzymes: Application to Protein Mixtures*. Journal of Biological Chemistry, 1961. **236**(5): p. 1372-1379.
32. Percy, A.K., et al., *Characterization of brain phosphatidylserine decarboxylase: Localization in the mitochondrial inner membrane*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1983. **223**(2): p. 484-494.
 33. Zborowski, J., A. Dygas, and L. Wojtczak, *Phosphatidylserine decarboxylase is located on the external side of the inner mitochondrial membrane*. FEBS Letters, 1983. **157**(1): p. 179-182.
 34. Cullis, P.R., et al., *Structural properties of lipids and their functional role in biological membranes*. Membrane Fluidity in Biology, 1983. **vol. 1**: p. 39–81.
 35. Verkleij, A.J., et al., *Non-bilayer structures in membrane fusion*. Ciba Found Symp, 1984. **103**: p. 45-59.
 36. Martens, S. and H.T. McMahon, *Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 543-56.
 37. Böttinger, L., et al., *Phosphatidylethanolamine and Cardiolipin Differentially Affect the Stability of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes*. Journal of Molecular Biology, 2012. **423-248**(5): p. 677-686.
 38. Steenbergen, R., et al., *Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40032-40.
 39. Osman, C., D.R. Voelker, and T. Langer, *Making heads or tails of phospholipids in mitochondria*. J Cell Biol, 2011. **192**(1): p. 7-16.
 40. Joshi, A.S., et al., *Cardiolipin and Mitochondrial Phosphatidylethanolamine Have Overlapping Functions in Mitochondrial Fusion in Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(21): p. 17589-17597.
 41. Tamura, Y., et al., *Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria*. J Cell Biol, 2009. **185**(6): p. 1029-45.
 42. Osman, C., et al., *The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria*. J Cell Biol, 2009. **184**(4): p. 583-96.
 43. Kuroda, T., et al., *FMP30 is required for the maintenance of a normal cardiolipin level and mitochondrial morphology in the absence of mitochondrial phosphatidylethanolamine synthesis*. Mol Microbiol, 2011. **80**(1): p. 248-65.
 44. Pfeiffer, K., et al., *Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52873-80.
 45. Zhong, Q., et al., *Absence of Cardiolipin Results in Temperature Sensitivity, Respiratory Defects, and Mitochondrial DNA Instability Independent of pet56*. Journal

- of Biological Chemistry, 2004. **279**(31): p. 32294-32300.
46. Emoto, K. and M. Umeda, *An essential role for a membrane lipid in cytokinesis. Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine.* J Cell Biol, 2000. **149**(6): p. 1215-24.
 47. Pécheur, E.-I., et al., *Phospholipid Species Act as Modulators in p97/p47-Mediated Fusion of Golgi Membranes.* Biochemistry, 2002. **41**(31): p. 9813-9823.
 48. van Dijck, P.W.M., et al., *Comparative studies on the effects of pH and Ca²⁺ on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1978. **512**(1): p. 84-96.
 49. Horibata, Y. and H. Sugimoto, *StarD7 Mediates the Intracellular Trafficking of Phosphatidylcholine to Mitochondria.* The Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(10): p. 7358-7365.
 50. Xu, Y., et al., *The enzymatic function of tafazzin.* J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39217-24.
 51. Yang, L., et al., *The Phosphatidylcholine Transfer Protein Stard7 is Required for Mitochondrial and Epithelial Cell Homeostasis.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 46416.
 52. Daum, G., *Lipids of mitochondria.* Biochim Biophys Acta, 1985. **822**(1): p. 1-42.
 53. Jiang, F., et al., *Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function.* J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22387-94.
 54. Schlame, M., et al., *Kinetic analysis of cardiolipin synthase: A membrane enzyme with two glycerophospholipid substrates.* Lipids, 1995. **30**(7): p. 633-640.
 55. Matsko, C.M., et al., *Mitochondrial Lipid Alterations during Fas- and Radiation-Induced Apoptosis.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **287**(5): p. 1112-1120.
 56. Subramanian, M., A. Jutila, and P.K.J. Kinnunen, *Binding and Dissociation of Cytochrome c to and from Membranes Containing Acidic Phospholipids.* Biochemistry, 1998. **37**(5): p. 1394-1402.
 57. Tasseva, G., et al., *Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology.* Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(6): p. 4158-4173.
 58. Murray, N.R. and A.P. Fields, *Phosphatidylglycerol is a physiologic activator of nuclear protein kinase C.* J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11514-20.
 59. Hatch, G.M., S.G. Cao, and A. Angel, *Decrease in cardiac phosphatidylglycerol in streptozotocin-induced diabetic rats does not affect cardiolipin biosynthesis: evidence for distinct pools of phosphatidylglycerol in the heart.* Biochem J, 1995. **306** (Pt 3): p.

- 759-64.
60. Li, Z., et al., *The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 321-31.
 61. Harrison, F., et al., *Hematopoietic stem cell gene therapy for the multisystemic lysosomal storage disorder cystinosis*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2013. **21**(2): p. 433-444.
 62. Huang, L.S., et al., *The Mitochondrial Cardiolipin Remodeling Enzyme Lysocardiolipin Acyltransferase Is a Novel Target in Pulmonary Fibrosis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2014. **189**(11): p. 1402-1415.
 63. Perez Ruiz de Garibay, A., *Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors*. Wien Med Wochenschr, 2016. **166**(7-8): p. 227-35.
 64. Cenacchi, T., et al., *Cognitive decline in the elderly: a double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration*. Aging (Milano), 1993. **5**(2): p. 123-33.
 65. Kato-Kataoka, A., et al., *Soybean-derived phosphatidylserine improves memory function of the elderly Japanese subjects with memory complaints*. Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2010. **47**(3): p. 246-255.
 66. Pandey, N.R. and D.L. Sparks, *Phospholipids as cardiovascular therapeutics*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(3): p. 281-5.
 67. Küllenberg, D., et al., *Health effects of dietary phospholipids*. Lipids in Health and Disease, 2012. **11**(1): p. 3.
 68. Chen, W.-W., et al., *Phosphatidylglycerol Incorporates into Cardiolipin to Improve Mitochondrial Activity and Inhibits Inflammation*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 4919.
 69. Chang, R.S., et al., *Reduced dose-limiting toxicity of intraperitoneal mitoxantrone chemotherapy using cardiolipin-based anionic liposomes*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. **6**(6): p. 769-776.
 70. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION*. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959. **37**(8): p. 911-917.